



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA VETERINARIA

**VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ DELL'ESAME MICROSCOPICO DEL
CITOCENTRIFUGATO DEL SANGUE PERIFERICO PER LA DIAGNOSI DI
LEISHMANIOSI CANINA**

Il Candidato

Raffaele Petragli

Il Relatore

Prof. Francesca Mancianti

Il Correlatore

Prof. Michele Corazza

ANNO ACCADEMICO 2007-2008

Parole chiave: *leishmaniosi canina, Phlebotomus, patogenesi, immunologia, diagnosi, parassitemia, citocentrifugazione, Cytospin.*

Riassunto. La leishmaniosi è una delle più gravi malattie del cane. Causata da un protozoo parassita (*Leishmania infantum* nel bacino del Mediterraneo), generalmente trasmesso dalle punture di un insetto ematofago (genere *Phlebotomus*), ha importanza anche dal punto di vista della salute pubblica, in considerazione del potenziale zoonotico della patologia. La diffusione della leishmaniosi canina, in costante aumento in tutta Italia, risulta influenzata dalla prevalenza dell'infezione non solo nel cane, ma anche in diversi mammiferi sinantropi e selvatici e, probabilmente, anche nell'uomo, soprattutto in soggetti immunodepressi. Questa espansione è in relazione anche al riscaldamento globale del pianeta, che determina la diffusione e la colonizzazione da parte del vettore di aree in cui in precedenza era ritenuto assente.

Dopo una rassegna approfondita di tutte le caratteristiche della patologia e del vettore, questo lavoro si focalizza sull'importanza dei metodi diagnostici, in quanto, in mancanza di una profilassi vaccinale realmente efficace, il controllo dell'infezione si basa soprattutto sulla terapia, che non può prescindere da una corretta diagnosi. Nonostante i progressi dei metodi sierologici e molecolari, l'osservazione diretta del parassita nei materiali biologici, rappresenta ancora la diagnosi più certa e relativamente semplice. In questo senso, è stato valutato un metodo di concentrazione dei parassiti nei leucociti del sangue periferico (citocentrifugazione mediante Cytospin®), al fine di individuare un possibile protocollo diagnostico caratterizzato da un'invasività veramente minima.

Key words: *canine leishmaniasis, Phlebotomus, pathogenesis, immunology, diagnosis, parasitemia, cytocentrifugation, Cytospin.*

Abstract. Canine leishmaniasis is one of the most serious diseases of dogs. Caused by a protozoan parasite (*Leishmania infantum* in the Mediterranean basin), generally transmitted by the bites of an hematofagous insect (genus *Phlebotomus*), is also important from the viewpoint of public health, given the zoonotic potential of the disease. The spread of canine leishmaniasis, rising steadily throughout Italy, is influenced by prevalence of infection not only in dogs but also in other sinantropic and wild mammals, and probably in humans, especially in those immunologically depressed. This expansion is also in relation to global warming, which determines the spread and colonization by the vector of areas in which previously was considered absent.

After a thorough review of all the characteristics of the disease and vector, this work focuses on the importance of diagnostic methods because, in the absence of a vaccination truly effective, control of infection is particularly based on therapy, which must be based on a correct diagnosis. Despite the progress of molecular and serological methods, the direct observation of the parasite in biological materials, is still the diagnosis more certain and relatively simple. In this sense, was assessed a method of concentration of parasites in the peripheral blood leukocytes (cytocentrifugation by Cytospin®), in order to identify a possible diagnostic protocol characterized by a really minimal invasiveness.

Sommario

1.	INTRODUZIONE	1
2.	LA LEISHMANIOSI CANINA	3
2.1.	EPIDEMIOLOGIA	3
2.1.1.	<i>Serbatoi e diffusione</i>	3
2.1.2.	<i>Predisposizione</i>	10
2.1.3.	<i>L'importanza degli ospiti asintomatici</i>	12
2.1.4.	<i>Trasmissione</i>	13
2.2.	EZIOLOGIA	16
2.2.1.	<i>Leishmania</i>	16
2.2.1.1.	Biologia di <i>Leishmania</i> nel flebotomo vettore	20
2.2.1.2.	Trasmissione al mammifero ospite	23
2.2.2.	<i>Il flebotomo</i>	25
2.2.2.1.	Biologia	27
2.3.	PATOGENESI	33
2.3.1.	<i>Immunologia</i>	42
2.4.	SINTOMATOLOGIA	48
2.4.1.	<i>Primi sintomi</i>	52
2.4.2.	<i>Periodo conclamato</i>	52
2.4.3.	<i>Periodo finale</i>	53
2.4.4.	<i>Manifestazioni atipiche</i>	53
2.4.4.1.	Lesioni cutanee	53
2.4.4.2.	Segni muscoloscheletrici	55
2.4.4.3.	Manifestazioni cardiovascolari	56
2.4.4.4.	Malattia renale isolata	56
2.4.4.5.	Manifestazioni digestive	56
2.4.4.6.	Disordini emostatici	57
2.4.4.7.	Segni respiratori	58
2.4.5.	<i>Co-infezioni/infezioni</i>	58
2.5.	TERAPIA	60
2.5.1.	<i>Classificazione (stadiazione)</i>	60
2.5.2.	<i>Terapia specifica</i>	61
2.5.2.1.	Tra farmaci vecchissimi, recenti e nuovissimi	64
2.5.3.	<i>Immunoterapia ed immunomodulatori</i>	74
2.5.3.1.	Glicocorticoidi	74
2.5.3.2.	Domperidone	76
2.5.3.3.	Altri approcci immunoterapici	77
2.5.4.	<i>Patologia renale</i>	77
2.6.	PROFILASSI	81
2.6.1.	<i>La lotta contro il vettore</i>	81
2.6.2.	<i>Vaccinazione</i>	83
3.	DIAGNOSI DI LABORATORIO	86
3.1.	ESAMI ASPECIFICI	88
3.1.1.	<i>Esame emocromocitometrico</i>	89
3.1.2.	<i>Velocità di eritrosedimentazione</i>	90
3.1.3.	<i>Proteine totali e sieroelettroforesi</i>	90
3.1.4.	<i>Esame delle urine</i>	99
3.1.5.	<i>Profilo renale</i>	101
3.1.6.	<i>Profilo epatico</i>	105
3.1.7.	<i>Altre alterazioni di laboratorio</i>	105
3.2.	ESAMI SPECIFICI	106
3.2.1.	<i>Sierologia</i>	106
3.2.1.1.	Emoagglutinazione indiretta (IHAT)	107
3.2.1.2.	Agglutinazione diretta (DAT)	108
3.2.1.3.	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	108
3.2.1.4.	Immunofluorescenza indiretta (IFAT)	111

3.2.1.5.	Immunomigrazione rapida.....	114
3.2.2.	<i>Valutazione della risposta immunitaria cellulare</i>	115
3.2.2.1.	Test cutaneo alla leishmanina (LST, reazione di Montenegro)	117
3.2.3.	<i>Esame colturale</i>	118
4.	PCR	121
4.1.	GENERALITÀ.....	121
4.2.	CONTAMINAZIONI	123
4.3.	STANDARDIZZAZIONE	124
4.4.	PCR QUANTITATIVA.....	125
4.5.	APPLICAZIONI PRATICHE.....	127
5.	ESAMI MICROSCOPICI CITOLOGICI	133
5.1.	CITOLOGIA LINFONODALE.....	133
5.2.	CITOLOGIA MIDOLLARE.....	136
5.3.	CITOLOGIA CUTANEA E DERMICA	138
5.4.	AMASTIGOTI NEL SANGUE PERIFERICO	139
6.	PARTE SPERIMENTALE	149
6.1.	SCOPI	149
6.2.	MATERIALI E METODI	152
6.2.1.	<i>Citocentrifuga</i>	152
6.2.2.	<i>Soggetti ed esami diagnostici</i>	155
6.2.3.	<i>Protocollo della citocentrifugazione</i>	159
6.2.4.	<i>PCR</i>	161
6.2.4.1.	Estrazione	161
6.2.4.2.	Amplificazione	162
6.2.4.3.	Elettroforesi	163
6.2.5.	<i>Altri metodi diagnostici</i>	163
6.3.	RISULTATI	165
6.4.	DISCUSSIONE.....	168
7.	BIBLIOGRAFIA	III
8.	INDICE DELLE FIGURE	XXXIV
9.	INDICE DELLE TABELLE	XXXV
10.	RINGRAZIAMENTI	XXXVI

1. INTRODUZIONE

La leishmaniosi è una malattia parassitaria a carattere zoonosico¹ e ad andamento generalmente cronico, causata da protozoi del genere *Leishmania*. L'infezione colpisce prevalentemente i mammiferi (uomo, canidi e roditori), anche se esistono parassiti propri dei sauri, di scarso interesse veterinario (Casarosa, 1985[1]).

Molto probabilmente la prima segnalazione di una lesione cutanea da *Leishmania* si deve a Cunningham (1885), il quale riportò la presenza, su sezioni di tessuto, di corpi di 12,6 µm x 8,8 µm (presumibilmente macrofagi parassitati) contenenti delle formazioni che l'Autore interpretò come spore di *Mycetozoa*. Nel 1898 Borowsky descrisse, su strisci e sezioni di bottoni, numerosi corpuscoli di 1,5 µm di diametro, contenenti un nucleo ed un "processo" che si originava dal nucleo stesso dirigendosi alla periferia del corpo. Successivamente Leishman (1903) a Calcutta, durante la necropsia di un giovane soldato, osservò lesioni da dissenteria nel colon ed una milza megalica e congesta, la cui polpa conteneva una discreta quantità di formazioni ovoidali e rotondeggianti di 2-3 µm di diametro. Tre anni dopo, a Londra, esaminando un ratto morto, sperimentalmente infettato da tripanosomi africani, notò la somiglianza dei "corpiccioli" precedentemente osservati con i tripanosomi degenerati del ratto. Nello stesso anno Donovan, esaminando strisci di biopsia splenica di un indiano di 12 anni sofferente di febbri irregolari, osservò corpi che non ritenne essere né artefatti né tripanosomi degenerati. Laveran e Mesnil, analizzando i vetrini inviati da Donovan, conclusero che i corpi osservati erano parassiti degli eritrociti e ne proposero il nome di *Piroplasma donovani*. Gli stessi vetrini furono osservati da Ross il quale criticò le conclusioni dei due precedenti Autori, affermando che i parassiti erano sovrapposti ai globuli rossi e ricordavano forme involute di tripanosomi. Ross quindi descrisse il parassita e ne propose l'appartenenza ad un nuovo genere di nome *Leishmania*, classe *Sporozoa*. Successivamente il parassita osservato fu definito *Leishmania donovani* (Laveran e Mesnil) Ross 1903 (Gramiccia, 1989).

¹ Zoonosi: malattia trasmissibile tra gli animali e l'uomo (Boden, 2005).

La prima segnalazione di leishmaniosi canina è del 1908 (Nicolle e Comte); il primo a sospettare i flebotomi come agenti vettori del parassita fu Pressat (1905).

Le varie forme di leishmaniosi umana (viscerale, cutanea, mucosa, dermica post-viscerale) rappresentano in certe aree dei veri e propri flagelli, in particolare nei Paesi della fascia equatoriale e sub-equatoriale. Viene stimato infatti che siano infette oltre 12 milioni di persone al mondo, con 350 milioni di individui a rischio ed un incremento di nuovi casi da 400.000 a 2 milioni all'anno (Ramos Franco, 1997). La malattia è endemica in molte aree di Africa, India, Medio Oriente, Europa meridionale, America Centrale e Meridionale. Inoltre, in diverse parti del mondo, rappresenta un serio problema nelle persone HIV positive (Handman, 2001).

La maggior parte delle forme di leishmaniosi sono zoonosi ed i serbatoi sono rappresentati da alcune specie di mammiferi, responsabili del mantenimento a lungo termine di *Leishmania* in natura (Ashford, 1996). In base alle specie dei parassiti in causa, i serbatoi possono essere rappresentati da mammiferi selvatici, domestici o anche, in casi particolari, esseri umani. Nel caso della leishmaniosi viscerale umana i diversi tipi di serbatoi corrispondono a differenti tappe evolutive nel cammino verso l'antropizzazione delle zoonosi selvatiche (Garnham, 1965). Molti serbatoi hanno raggiunto un adattamento a *Leishmania*, sviluppando forme d'infezione di gravità moderata, o anche del tutto asintomatiche, che possono persistere per molti anni, con l'importante eccezione del cane che solitamente sviluppa una malattia generalizzata e fatale (Dedet, 2002).

Per quanto riguarda la leishmaniosi cutanea umana, può accadere che soggetti (che vivono da sempre nelle aree endemiche) risultino sierologicamente positivi ma asintomatici, e non è chiaro se ciò dipenda da un tipo d'immunità innata oppure acquisita. Sarebbe stato dimostrato che l'esposizione alle punture di flebotomi non infetti proteggerebbe contro future infezioni (Kamhawi *et al.*, 2000). Le persone e gli animali che vivono nelle aree endemiche vengono punti continuamente dai flebotomi, e questo teoricamente li proteggerebbe. Se questo venisse veramente provato, ci potremmo aspettare che la gravità dei segni clinici, nell'uomo e negli animali, possa dipendere parzialmente da quante volte siano stati punti dai flebotomi non infetti (Shaw, 2002). Nel cane è stato verificato che il livello dell'esposizione ai flebotomi vettori può modulare il tasso di sieroconversione (Zaffaroni *et al.*, 1999).

2. LA LEISHMANIOSI CANINA

La leishmaniosi canina è una malattia protozoaria causata da *Leishmania infantum*, trasmessa da ditteri ematofagi comunemente detti flebotomi (genere *Phlebotomus* nel bacino del Mediterraneo) e colpisce primariamente il sistema reticolo-endoteliale, con andamento generalmente subacuto-cronico. Oliva (2002) ha definito la malattia una *lotta armata* tra il sistema immunitario dell'ospite ed i meccanismi di evasione del parassita, che quasi sempre assicura la sopravvivenza del microrganismo e la sua diffusione nella popolazione degli ospiti recettivi. Secondo Ferrer (2000) non tutti gli animali infetti divengono realmente leishmaniotici, ma solo quelli con una risposta immunitaria inefficace non protettiva; per cui la leishmaniosi canina può essere considerata la conseguenza di un'immunodeficienza specifica, più che di una semplice infezione.

2.1. Epidemiologia

2.1.1. Serbatoi e diffusione

Un serbatoio è un animale che serve da fonte dell'infezione umana (Campino, 2002). Secondo Bray (1982) un buon serbatoio:

- Dovrebbe essere in stretto contatto con l'uomo ed i flebotomi;
- Dovrebbe essere sensibile all'agente patogeno;
- Dovrebbe essere disponibile per il vettore in quantità sufficiente ed in uno stato suscettibile per causare l'infezione;
- Dovrebbe rappresentare la fonte principale per il pasto del flebotomo e condividere con questo lo stesso habitat;
- La malattia dovrebbe presentare un'evoluzione cronica per permettere all'animale di sopravvivere fino alla successiva stagione di trasmissione.

È evidente che il cane rappresenti l'esempio di un buon serbatoio di *Leishmania*. La natura comunque fatale della malattia canina suggerisce che questa specie sia un ospite recente in termini evolutivisti (Campino, 2002). Diverse ragioni farebbero

concludere che il cane è il serbatoio ideale: nelle aree in cui la leishmaniosi viscerale umana è endemica, la prevalenza dell'infezione canina è alta con ampie percentuali di soggetti asintomatici; il cane può presentare un intenso parassitismo a livello cutaneo aumentando la possibilità della trasmissione; il cane è in genere in stretto contatto con l'uomo ed il suo ambiente, e questo favorisce il mantenimento del ciclo domestico di trasmissione; il cane può rimanere infetto per anni o a vita, pur senza sintomi evidenti; lo zimodema MON-1 di *L. infantum*, responsabile dei casi di leishmaniosi viscerale umana nel bacino del Mediterraneo, è lo stesso che può essere isolato dal cane (Dantas-Torres, 2007).

Attualmente i più importanti serbatoi della zoonosi selvatica sono Roditori, Marsupiali ed Edentati; il cane è considerato il serbatoio di *L. infantum* e *L. peruviana*, specie che hanno un ciclo di trasmissione domestico o peri-domestico. L'uomo è comunemente riconosciuto l'ospite di *L. donovani* e *L. tropica*, che generalmente determinano la leishmaniosi viscerale e cutanea rispettivamente (Dedet, 2002).

L. infantum è l'agente eziologico della forma zoonosica di leishmaniosi viscerale di cui il cane è il più importante serbatoio; inoltre è anche responsabile della forma cutanea umana nel bacino del Mediterraneo. Nelle regioni endemiche la leishmaniosi canina non ha una distribuzione uniforme, bensì focale; inoltre la sieroprevalenza varia enormemente anche in aree contigue (Paranhos-Silva *et al.*, 1996; Deplazes *et al.*, 1998). Generalmente la distribuzione dei cani positivi nelle aree endemiche rispecchia la diffusione del vettore che risulta non uniforme (Evans *et al.*, 1992; Tselentis *et al.*, 1994). Quindi la natura focale della distribuzione dell'infezione può dipendere dall'esistenza di specifici fattori ecologici che soddisfano le caratteristiche biologiche del flebotomo vettore.

I tassi di sieroprevalenza appaiono fluttuare nel corso del tempo e ciò può essere dovuto ad un'ampia varietà di fattori, compresi gli interventi umani (per esempio: soppressione o trattamento dei cani infetti) e le variazioni naturali delle popolazioni di flebotomi (Campino, 2002). Al di fuori dell'Italia, nelle aree intorno alle grandi città, l'urbanizzazione della leishmaniosi è dovuta probabilmente al flusso degli abitanti dal centro alla periferia, con lo sviluppo di case di tipo monofamiliare con giardino in cui spesso vengono tenuti i cani. Questo tipo di sistemazione fornisce un habitat ideale al vettore ed alcuni Autori hanno riscontrato una maggiore prevalenza della leishmaniosi

canina in aree urbane o periurbane piuttosto che rurali (Tselentis *et al.*, 1994; Cunha *et al.*, 1995; Amela *et al.*, 1995). Ciononostante molte indagini hanno dimostrato che la leishmaniosi canina è ancora più frequente nelle aree rurali che in quelle urbane. Questo fatto è probabilmente correlato alla zoofilia del vettore, in un processo definito *deviazione trofica nelle aree rurali* (Abranches *et al.*, 1983).

È impossibile comparare i tassi di prevalenza basati su lavori che hanno utilizzato metodi diversi per rilevare l'infezione: inizialmente gli studi epidemiologici erano basati sull'osservazione diretta dei parassiti, poi questo metodo è stato sostituito da test sierologici più sensibili e poi dai metodi molecolari. Inoltre i tassi d'infezione ottenuti dalle medie dei dati raccolti in maniera passiva, non possono essere comparati con quelli risultanti dagli studi condotti *casa per casa* (Campino, 2002).

Una caratteristica comune dei focolai d'infezione da *L. infantum*² è che molto spesso il cane rappresenta il serbatoio peridomestico del parassita, anche se in alcune aree sono stati chiamati in causa altri mammiferi, in particolare canidi diversi e roditori, principalmente come serbatoi selvatici. Diverse specie di canidi che spesso vivono vicino agli ambienti umani, si sono rivelate infette, fungendo da potenziali serbatoi selvatici per la leishmaniosi viscerale (Abranches, 1989). La volpe è certamente la specie più rappresentata: nel bacino del Mediterraneo (Italia, Francia, Spagna, Portogallo) è stata proposta l'esistenza di un ciclo selvatico autonomo o semiautonomo, mentre in Brasile è probabile che le volpi non mantengano un ciclo di trasmissione indipendente dai cani infettanti. In un'indagine sierologica condotta nella provincia di Imperia, su 50 volpi esaminate, il 18% era positivo e gli autori, in base al principio che è necessaria una prevalenza minima del 2,5% per mantenere l'endemicità (Rioux *et al.*, 1971), hanno suggerito che le volpi possano introdurre l'infezione in zone in cui in precedenza era assente (Mancianti *et al.*, 1994). Analizzando 50 carcasse di volpi, Dipineto e coll. (2007) hanno riscontrato una positività alla PCR del 40% (tutti i 20 soggetti positivi avevano DNA di *Leishmania* nei campioni linfonodali e midollari, 17 soggetti in quelli cutanei).

² Un focolaio accertato di leishmaniosi è definito allorché sono soddisfatte le seguenti tre condizioni: (i) conferma di uno o più casi di leishmaniosi canina; (ii) identificazione di almeno 2 soggetti sieropositivi tra i cani residenti asintomatici; (iii) rilevazione di *Phlebotomus* nell'area. Si parla di focolaio sospetto se sono soddisfatte solo le condizioni (i) e (ii), oppure (i) e (iii) (Maroli *et al.*, 2008).

Un ruolo importante è rivestito dai cani randagi; infatti sono spesso malnutriti e malati e quindi molto suscettibili alla malattia. In base alle caratteristiche che deve possedere un serbatoio, la semplice suscettibilità alla malattia non può corrispondere allo stato di serbatoio. Un animale può essere ospite accidentale od occasionale (spesso come tappa terminale del ciclo di trasmissione), ma può comunque introdurre o reintrodurre il parassita in aree non endemiche e quindi rivestire un ruolo importante nell'epidemiologia della leishmaniosi (Campino, 2002). Per quanto riguarda il ruolo nella diffusione di specie diverse da *L. infantum*, come *L. major*, il cane è più probabilmente "vittima" piuttosto che serbatoio. Ciononostante si hanno a disposizione sufficienti prove epidemiologiche e sperimentali a supporto del ruolo del cane come principale serbatoio dell'infezione da *L. infantum*; e quindi si può concludere che il cane domestico riveste una posizione importante nell'epidemiologia della leishmaniosi viscerale zoonosica. Ma allora perché i programmi di soppressione di massa (condotti in varie zone del mondo, in particolare, a più riprese, in Brasile) non riescono a controllare la leishmaniosi viscerale umana? La risposta definitiva a questa domanda è ancora sconosciuta. Benché alcuni autori abbiano rilevato una diminuzione dei casi di leishmaniosi umana e canina tramite l'eliminazione sistematica dei cani infetti (Ashford *et al.*, 1998), o per mezzo di misure di controllo integrate, come il trattamento dei soggetti canini prepatenti e la soppressione di quelli giudicati clinicamente irrecuperabili (Gradoni *et al.*, 1988), non può essere esclusa la partecipazione nel ciclo di trasmissione del parassita di altri ospiti serbatoi, come persone infette asintomatiche³ e gatti; così come non si può sottovalutare il fatto che molto spesso i cani soppressi vengono sostituiti da altri, quasi sempre giovani, a loro volta sensibili all'infezione da *Leishmania* e ad altri patogeni; inoltre i nuovi cani possono essere a loro volta già infetti. In microaree endemiche del Brasile, in cui è stato applicato lo *stamping-out* intensivo, almeno la metà dei cani è nuovamente positiva nel giro di 2,5 anni. Infine preme ricordare che questi programmi di soppressione sono stati a lungo basati solo sulla positività sierologica che può non corrispondere allo stato di portatore infettante⁴ (Dietze *et al.*, 1997; Dantas-Torres,

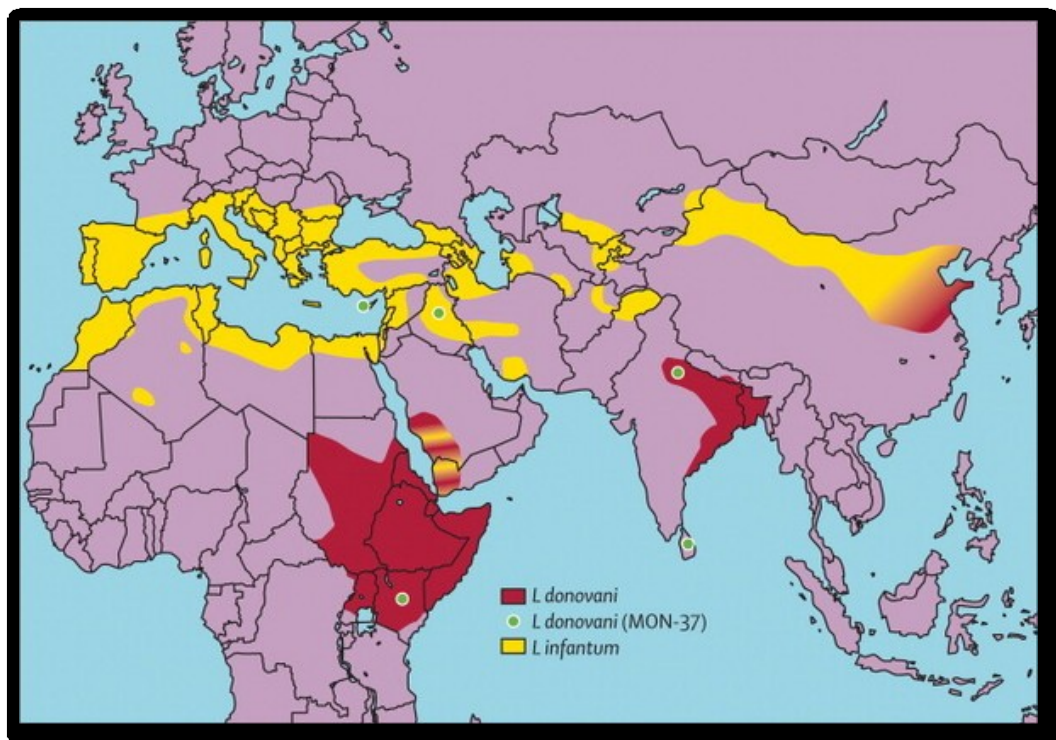
³ Attualmente, sulla base di dati epidemiologici e sperimentali, l'uomo è considerato uno dei possibili serbatoi del ciclo domestico di *Leishmania braziliensis*, benché non ne sia provato il ruolo come serbatoio principale (Dantas-Torres, 2007).

⁴ In Brasile, in molti casi, vengono soppressi cani di proprietà solo sulla base della sintomatologia (Gomes *et al.*, 2007).

2007). È indubbio che la soppressione dei cani come strategia di controllo della leishmaniosi viscerale umana, vada interamente rivista (Nunes *et al.*, 2008).

Oltre al cane, l'importanza di altre specie domestiche nell'epidemiologia della leishmaniosi non è ancora molto chiara, anche se in letteratura ci sono segnalazioni di casi sporadici d'infezione in specie non consuete, come per esempio il cavallo (con lesioni cutanee che probabilmente corrispondono ai siti di puntura e che spesso regrediscono anche senza terapia specifica) ed il gatto. Per quanto riguarda quest'ultima specie, attualmente è indubbio un ruolo epidemiologico, in quanto l'infezione può generalizzare - con forme cliniche cutanee solitamente meno gravi rispetto al cane - e può essere trasmessa ai flebotomi (xenodiagnosi) (Maroli *et al.*, 2007). È stato postulato che alcune gravi virosi feline (da FIV, FeLV, FIPV), che possono essere concomitanti all'infezione da *Leishmania*, rappresentino fattori di stress concomitanti che potrebbero favorire il manifestarsi della malattia. Ma la sporadicità dei casi clinici felini, anche in aree endemiche per *Leishmania* in cui si registra un'elevata sieroprevalenza per FIV, suggerirebbe una resistenza su base genetica del gatto nei confronti del parassita (Mancianti, 2004).

Figura 1 - Distribuzione di *Leishmania* nel Vecchio Mondo (Antoniou *et al.*, 2008).



In Italia l'infezione da *Leishmania* è sicuramente sottostimata, sia nel cane che nell'uomo, in quanto spesso vengono ignorati i casi asintomatici od oligosintomatici,

anche se attualmente l'individuazione dei casi *occulti* è resa più agevole grazie all'affidabilità dei test diagnostici ed all'istituzione - in alcune regioni - degli Osservatori Epidemiologici Regionali (O.E.R.), ancora carenti per quanto concerne la medicina veterinaria (Favati *et al.*, 2000). Se fino ai primi anni Ottanta la leishmaniosi canina, ad esclusione della Liguria, era considerata praticamente assente dalle regioni del Nord Italia (Piemonte, Valle D'Aosta, Lombardia, Trentino-Alto Adige, Veneto, Friuli-Venezia Giulia), successivamente è apparsa evidente la sua diffusione in quasi tutte le regioni, con una prevalenza che è aumentata nel tempo, soprattutto nelle zone rurali o periurbane della fascia costiera tirrenica, nelle aree collinari ad ovest della dorsale appenninica (fino a 500-600 metri s.l.m.), nelle regioni costiere del Mar Ionio e del basso Adriatico fino al Gargano ed in tutte le isole (maggiori e minori) (Pugliese, 2001). Indubbiamente la leishmaniosi canina resta maggiormente diffusa nell'Italia Centrale e Meridionale, con prevalenze locali che raggiungono anche il 48,4%, anche se con differenze notevoli a seconda dell'area, della stagionalità e del microhabitat (Paradies *et al.*, 2006). Ma oggi ci sono focolai accertati anche in Veneto, Emilia Romagna, Piemonte, Trentino e Lombardia (Natale, 2004). In Piemonte sono state accertate 3 differenti aree in cui la leishmaniosi canina è endemica (zone di Torino, Ivrea e Casale), con una sieroprevalenza che va dal 3,9% al 5,8%. È stato identificato anche un possibile focolaio instabile in Valle D'Aosta: in quest'area montuosa non erano mai stati segnalati flebotomi in precedenti stazioni di cattura. In queste aree la colonizzazione può essere avvenuta spontaneamente dalle zone costiere o in seguito agli aumentati movimenti di persone dalle aree mediterranee in cui abbondano i flebotomi. Qui la presenza stagionale dei flebotomi va dalla seconda metà di maggio a settembre. Nel 2003 una ricerca mirata svolta in varie regioni del Nord Italia su un campione di oltre 2.000 soggetti, ha evidenziato una sieroprevalenza che si aggira intorno al 2,5% (nelle varie regioni e nei singoli focolai), che sarebbe la soglia minima affinché un focolaio possa mantenersi ed essere considerato stabile, con una notevole percentuale (85,5%) di casi autoctoni (Capelli *et al.*, 2004). In base ad analogie climatiche e caratteristiche ambientali, si può anche prevedere che la diffusione della malattia s'estenderà nel prossimo futuro ad altre zone del Nord Italia e dell'Europa centrale (Ferroglia *et al.*, 2005). A causa della distribuzione massiccia del serbatoio canino e della frequente importazione di cani infetti, il principale limite alla trasmissione della leishmaniosi viscerale zoonosica, è rappresentato dalla disponibilità del flebotomo vettore, le cui distribuzione e densità risultano altamente dipendenti

dalla temperatura e dall'umidità relativa ambientali. Per cui è probabile che la trasmissione della malattia sia influenzata dai cambiamenti climatici (*global warming*) in quanto, nelle nostre zone temperate, gli incrementi della temperatura possono portare ad un accorciamento del periodo di sviluppo larvale del vettore, ad un prolungamento della stagione dell'accoppiamento delle specie di *Phlebotomus* già presenti ed alla diffusione di nuove specie. In base agli ultimi dati sperimentali e retrospettivi che riguardano l'Italia settentrionale, è molto probabile che attualmente si stia assistendo alla diffusione verso nord della leishmaniosi (Maroli *et al.*, 2008).

La comprensione della struttura e della distribuzione dei focolai di leishmaniosi canina è importante soprattutto per ragioni di sanità pubblica, in quanto è evidente che in alcune aree (per es.: in Campania) la diffusione della malattia nel cane è strettamente correlata all'insorgenza dei casi di leishmaniosi viscerale umana (Baldi *et al.*, 2004). Analoga importanza è rivestita dalla sorveglianza dei casi di leishmaniosi umana importati in Italia. Benché nel nostro Paese *Ph. perniciosus* rivesta un ruolo preponderante nella trasmissione della malattia, sono presenti anche altre specie che sono vettori noti di differenti leishmanie in altri paesi del bacino del Mediterraneo (come *Ph. papatasi*, vettore di *L. major*, o *Ph. sergenti* di *L. tropica*). Con l'aumento degli spostamenti delle popolazioni e dei cambiamenti climatici, possono essere identificati nuovi fattori di rischio, associati alla distribuzione geografica delle diverse specie di *Leishmania*, che debbono essere tenuti in considerazione nella sorveglianza della leishmaniosi: introduzione di nuove popolazioni di *L. infantum* da altri paesi endemici, non solo mediterranei; introduzione di nuove specie di *Leishmania* (con particolare attenzione a quelle del complesso *L. donovani*) che possono trovare in Italia una nicchia adatta al completamento del ciclo biologico. Dal 1986 al 2004 vennero identificati 48 casi importati di leishmaniosi umana in Italia; i pazienti erano per lo più turisti italiani di ritorno dall'esterno, ed una minima parte erano immigrati residenti in Italia che periodicamente ritornavano nel paese d'origine (soprattutto casi di leishmaniosi cutanea negli immigrati del Nord Africa). I fattori di rischio per l'introduzione di nuove specie di *Leishmania*, per il momento, non destano particolari preoccupazioni, perché in genere i casi importati riguardano specie di *Leishmania* (*L. major* e *L. aethiopica*) la cui introduzione nel nostro Paese richiederebbe la presenza di una specifica nicchia ecologica, non limitata al solo vettore, ma anche a possibili serbatoi naturali (Gramiccia *et al.*, 2004).

2.1.2. Predisposizione

Generalmente si ritiene che l'infezione nel cane non sia correlata al sex (Amela *et al.*, 1995; Acedo-Sánchez *et al.*, 1996; Morillas *et al.*, 1996; Paranhos-Silva *et al.*, 1996), anche se è stata riportata una prevalenza superiore nei cani maschi anziani rispetto alle femmine (Fisa *et al.*, 1999; Zaffaroni *et al.*, 1999). È ampiamente ammesso però che il testosterone ed il 17- β -estradiolo siano due ormoni coinvolti in senso opposto nel dimorfismo sessuale del sistema immunitario: il primo ha effetto soppressivo sulle reazioni immunologiche, soprattutto cellulomediata, da cui deriverebbe una maggiore sensibilità a diverse malattie infettive; il secondo si ritiene contribuisca alla maggiore resistenza del sesso femminile a diverse malattie virali, batteriche e parassitarie. In particolare i due ormoni agiscono controllando la funzione e la biologia dei macrofagi, benché l'esatto meccanismo molecolare attraverso cui questo si verifica non sia molto chiaro (Liu *et al.*, 2005; 2006). È risultato inoltre che il criceto maschio infettato sperimentalmente sviluppa lesioni più gravi⁵ rispetto alla femmina (Travi *et al.*, 2002). Recentemente è stato dimostrato sperimentalmente che femmine di criceto gravide infette da *L. panamensis*, sviluppano cariche parassitarie sensibilmente inferiori rispetto a quelle non gravide; ciò è stato messo in relazione con l'azione degli estrogeni che inducono l'aumento dell'ossido nitrico (NO) macrofagico (Osorio *et al.*, 2008).

La prevalenza della patologia nei cani d'età inferiore ad un anno è piuttosto bassa, per il lungo periodo d'incubazione e per la stagionalità della trasmissione; invece i cani maggiormente colpiti sono quelli d'età superiore a 3 anni e questo probabilmente è in relazione al tempo d'esposizione all'attività dei flebotomi (Pozio *et al.*, 1982; Abranches *et al.*, 1991). Alcuni Autori ritengono che la prevalenza della leishmaniosi nelle varie età abbia una distribuzione bimodale, con l'80% dei cani infetti sotto i 3 anni, ed un altro picco, meno significativo, in corrispondenza degli 8-10 anni, allorché comincia a farsi sentire il declino immunologico dell'età avanzata (Amela *et al.*, 1995; Acedo-Sánchez *et al.*, 1996).

⁵ Maggiore estensione e gravità delle lesioni necrotiche cutanee e superiore carica parassitaria nei linfonodi tributari.

Anche se pare che il tipo di risposta immunitaria sia influenzato dal patrimonio genetico del soggetto infetto, non sappiamo con certezza se ci sia una razza canina più sensibile all'infezione. Alcune indagini epidemiologiche avrebbero mostrato che il Pastore Tedesco, il Dobermann ed il Boxer sono le razze più colpite (Abranches *et al.*, 1991; Campino *et al.*, 1995; Sideris *et al.*, 1999), ma c'è da considerare che la maggior parte di questi animali è adibita alla guardia in ambiente esterno e quindi l'esposizione ai flebotomi è certamente maggiore rispetto ai cani che vivono prevalentemente in ambiente domestico. Dunque le differenze del tasso d'infezione di una certa razza nelle aree rurali ed urbane, possono essere ascritte ai diversi usi legati ad un'attività prevalentemente extradomestica, rispetto alla vita da animali da compagnia in un ambiente domestico. È stato suggerito che i cani di razze a pelo lungo mostrino una prevalenza dell'infezione più bassa rispetto alle razze a pelo raso (Morillas *et al.*, 1996), anche se le aree maggiormente soggette alle punture dei flebotomi sono le orecchie ed il naso. È generalmente ammesso che il Segugio di Ibiza ed i meticci che vivono nelle aree endemiche, abbiano sviluppato un certo grado di resistenza (Solano-Gallego *et al.*, 2000), benché non sia del tutto chiaro se questo dipenda da un particolare substrato genetico o da adattamenti naturali alla costante pressione parassitaria e/o del vettore. Inoltre alcuni soggetti puri sarebbero maggiormente sensibili all'infezione (Abranches *et al.*, 1991). Il sequenziamento del gene canino ***Slc11a1*** (in precedenza *Nramp-1*) ha rivelato una possibile associazione tra le sue variazioni e la risposta immunitaria a *L. infantum* (Altet *et al.*, 2002); ricerche successive hanno confermato l'ipotesi, riscontrando nel Boxer proprio quelle modificazioni che lo renderebbero maggiormente suscettibile alla malattia (Sanchez-Robert *et al.*, 2005). Uno studio ulteriore ha dimostrato che dei 24 polimorfismi descritti nel gene, tre⁶ sono associati con un rischio maggiore di sviluppare la leishmaniosi, che comunque si realizza tramite l'interazione con altri geni, come quelli che codificano per gli antigeni del MHC di classe II (Sanchez-Robert *et al.*, 2008).

Anche ammettendo l'esistenza di alcune razze o linee di sangue con una diversa predisposizione su base genetica, ci sono anche fattori di virulenza che dipendono dal parassita (Alvar *et al.*, 2005). Nel cane e nell'uomo il decorso dei diversi quadri clinici che possono caratterizzare l'infezione da *Leishmania*, non dipende solo dall'interazione

⁶ Introne 6 (A4549G), esone 8 (C4859T) e introne 13 (C8542T).

tra il parassita e l'ospite - in particolare il sistema immunitario - ma anche dal caratteristico patrimonio genetico individuale e da una certa differenza di virulenza, all'interno dello stesso zimodema MON-1 di *L. infantum*. I gradi più elevati d'infettività risultano associati a livelli di crescita più rapidi dei promastigoti in coltura e ad una maggiore efficienza nell'infezione dei macrofagi. Inoltre gli stipiti IMT 151, IMT 311 e IMT 341 (*L. infantum* MON-1 isolati dall'uomo e dal cane nel bacino del Mediterraneo) inducono i macrofagi a produrre livelli più elevati di TGF- β . Questa citochina antinfiammatoria sembra essere un fattore importante per la sopravvivenza di *Leishmania* nelle cellule dell'ospite; infatti inibisce la risposta immunitaria di tipo Th1 e l'attivazione dei macrofagi, attraverso la soppressione di IFN- γ , la diminuzione dell'espressione dell'MHC di classe II e la produzione di NO \bullet . Nell'infezione sperimentale del topo, solo gli stipiti più virulenti inducono splenomegalia, alte cariche parassitarie nella milza e nel fegato ed un'intensa risposta immunitaria umorale, con la produzione di alti livelli di anticorpi anti-*Leishmania* IgG1, suggerendo una polarizzazione verso una risposta di tipo Th2 e conseguentemente la progressione della malattia (Baptista-Fernandes *et al.*, 2007).

2.1.3. L'importanza degli ospiti asintomatici

Fino ad un recente passato, i cani infetti asintomatici non erano considerati infettanti o solo leggermente infettanti, mentre i sintomatici sono sempre stati considerati in grado d'infettare un'ampia proporzione (70-80%) degli ospiti vettori. Negli ultimi tempi appare invece un dato acquisito il fatto che i cani asintomatici possano trasmettere l'infezione ai flebotomi con tassi paragonabili a quelli ottenuti con soggetti sintomatici, benché questi ultimi siano sempre da considerare maggiormente infettanti, soprattutto in relazione alla maggiore presenza degli amastigoti nelle aree cutanee lesionate, piuttosto che in quelle intatte (Campino, 2002). In Brasile, in una sperimentazione tramite xenodiagnosi, è risultato che il tasso d'infettività per *Lutzomyia longipalpis*, è del 5,4% per i soggetti asintomatici, del 5,1% per gli oligosintomatici e del 28,4% per i sintomatici (Michalsky *et al.*, 2007). Anche se la probabilità di dimostrare la presenza del parassita in genere aumenta insieme al titolo anticorpale ed alla gravità dei segni clinici, i dati sierologici non sono indicatori affidabili della presenza attuale dell'infezione. Indagini siero-epidemiologiche condotte in focolai di leishmaniosi canina in Europa, hanno rivelato che più della metà

dei soggetti sierologicamente positivi sono asintomatici. Dal punto di vista epidemiologico è dunque evidente l'importanza dell'identificazione di tutti i soggetti infetti, non solo di quelli sintomatici (Campino, 2002). In questo senso, i metodi sierologici andrebbero affiancati a quelli molecolari (Alvar *et al.*, 2004). La PCR, in generale ed almeno quando condotta a livello qualitativo, non permetterebbe di differenziare parassiti vivi ed attivi dal semplice DNA parassitario non vitale, e quindi Xavier e coll. (2006) raccomandano cautela nell'interpretazione dei risultati della PCR, perché la positività non necessariamente corrisponde alla presenza di parassiti vivi nei tessuti.

2.1.4. Trasmissione

La leishmaniosi è una malattia classicamente caratterizzata dalla **trasmissione indiretta**: i promastigoti di *Leishmania* vengono trasmessi agli ospiti vertebrati da piccoli insetti ematofagi - detti flebotomi - appartenenti ai generi *Sergentomya*, *Warileya*, *Brumptomyia*, *Lutzomyia* e *Phlebotomus*. Solo questi ultimi sono i responsabili della diffusione della malattia nelle zone endemiche del bacino del Mediterraneo (in particolare *Ph. perniciosus*, *Ph. perfiliewi*, *Ph. neglectus* e *Ph. major* sono i vettori di *L. infantum* in Italia). Indagini sierologiche hanno rivelato che, tra i cani infetti, una percentuale che può arrivare al 50-60%, è asintomatica, ed il 20% di questi soggetti presenta amastigoti a livello cutaneo. Sono questi cani a rappresentare gli autentici vettori e quindi un rischio epidemiologico evidente, a causa della difficoltà d'identificarli (Alvar *et al.*, 2004). Attualmente, però, altri potenziali meccanismi e vettori non possono essere trascurati: Coutinho e coll. (2005) hanno descritto la trasmissione orale sperimentale di *L. chagasi* (identica a *L. infantum*) tramite la zecca *Rhipicephalus sanguineus* in Brasile: l'artropode è stato in grado di mantenere l'infezione e di trasmetterla all'ospite (criceto), benché non siano stati rilevati promastigoti negli strisci approntati dai macerati delle zecche; quindi gli autori affermano che sussisterebbe la possibilità dell'ingestione di zecche infette da parte del cane durante le operazioni di pulizia e grattamento. Analogamente sono state chiamate in causa anche le pulci (*Ctenocephalides felis felis*) in base alla stretta relazione che si stabilisce con l'ospite canino, alla loro spiccata capacità di passare da un ospite all'altro, alle loro estreme voracità e frequenza di *feeding*, alla loro già comprovata capacità come vettori di microrganismi (come i tripanosomi), in relazione anche

all'abitudine di certi cani al leccamento ed al "mordicchiamento" di se stessi e di altri soggetti, con la possibile ingestione delle pulci ed in particolare del loro contenuto intestinale; questo potrebbe rappresentare un possibile meccanismo di trasmissione della leishmaniosi viscerale zoonosica, anche in considerazione della presenza della malattia in zone in cui i flebotomi sono ritenuti assenti. Nonostante tutto questo, Coutinho e Linardi (2007) non sono riusciti a dimostrare senz'ombra di dubbio l'effettiva possibilità della trasmissione attraverso la suddetta via. Comunque sia, l'interesse per la trasmissione meccanica, non è certo nuovo: già da anni sarebbe dimostrata la possibilità di contagio da parte di mosche (*Stomoxys calcitrans*) che si nutrono su lesioni cutanee di criceti leishmaniotici e che poi - immediatamente - si spostano su altri soggetti (Lainson e Southgate, 1965).

Per quanto riguarda una possibile **trasmissione diretta**, si impongono alcuni chiarimenti. La trasmissione materno-fetale risulta più volte ipotizzata e generalmente ammessa nell'uomo (Eltoum *et al.*, 1992; Meinecke *et al.*, 1999; Bogdan *et al.*, 2001; Figueiró-Filho *et al.*, 2004), benché pochi casi siano stati segnalati in letteratura (ma del resto nei paesi in cui la leishmaniosi viscerale è endemica, soprattutto in quelli in via di sviluppo, è praticamente impossibile distinguere l'infezione congenita da quella contratta in età infantile [Boehme *et al.*, 2006]), è stata ipotizzata anche nel cane (Masucci *et al.*, 2003). Mancianti e Sozzi (1995) riportarono l'isolamento da un cucciolo di 3 giorni d'età, nato da madre affetta da leishmaniosi cronica; ritenendo improbabile la trasmissione intrauterina, per le caratteristiche della placenta nella specie canina, ipotizzarono la trasmissione da microlesioni avvenute durante il parto. I risultati del lavoro di Andrade e coll. (2002) hanno escluso categoricamente la possibilità della trasmissione verticale, mentre Rosypal e coll. (2005[1]) sono giunti ad una conclusione diametralmente opposta. Che il rischio sia reale o teorico, non è stato identificato l'esatto meccanismo con cui la trasmissione verticale si realizzerebbe (Diniz *et al.*, 2005)⁷. La trasmissione venerea, benché mai provata senz'ombra di dubbio, appare possibile, per lo meno quella tra cane maschio infetto sintomatico e femmina, sulla scorta soprattutto delle ricerche di Diniz e coll. (2005) che, oltre a

⁷ Lainson e Bray (1964) riportarono che femmine di criceto leishmaniotiche (forma cutanea da *L. major*) e gravide, partorivano figli che in breve tempo sviluppavano la malattia, localizzata quasi esclusivamente alla faccia; invece i piccoli di una terza generazione, risultavano parassitologicamente sterili; gli autori conclusero che la trasmissione si verificava meccanicamente durante il contatto tra i piccoli e la cute materna nel corso dell'allattamento.

rinvenire amastigoti di *Leishmania* negli organi genitali interni (testicoli, epididimo) ed esterni (glande, prepuzio), hanno riscontrato una positività alla PCR nel seme di 8 su 22 (36,36%) cani sintomatici. Visto che nell'accoppiamento spesso si verificano traumi sia nel maschio che nella femmina, si realizza la possibilità di trasmissione di amastigoti dagli organi genitali esterni e di quelli presenti nel seme. Precedentemente Riera e Valladares (1996) avevano segnalato l'isolamento in coltura di *L. infantum* a partire dall'urina e dallo sperma di due cani (su 6) infettati sperimentalmente. Quindi nel cane la possibilità della trasmissione venerea della leishmaniosi è probabile, anche in considerazione dell'alto numero di cani infetti in aree in cui il flebotomo vettore è poco diffuso; e questo non sarebbe compatibile con una trasmissione unicamente mediata dal vettore (Diniz *et al.*, 2005; Rosypal e Lindsay, 2005). Lesioni a livello di glande e prepuzio sono state riportate nell'uomo affetto da leishmaniosi viscerale (Cain *et al.*, 1994; Schubach *et al.*, 1998) e cutanea (Cabello, 2002). Inoltre è stato ben documentato un caso di trasmissione venerea di leishmaniosi viscerale umana (Symmers, 1960). Nella cagna non si registrerebbe un analogo tropismo di *Leishmania* per gli organi genitali (Silva *et al.*, 2008): anche i pochi amastigoti che è possibile rilevare in queste sedi, risultano più da una diffusione ematica di fagociti in tali sedi (frequentemente interessate da fenomeni infiammatori), che da una "predilezione" specifica; infatti non sono state rilevate differenze significative nelle lesioni genitali tra cagne infette e non infette. C'è anche l'ipotesi di una variante di trasmissione venerea, che potrebbe avvenire simultaneamente alla trasmissione del sarcoma di Sticker (tumore venereo trasmissibile)⁸, in quanto sono stati trovati amastigoti, oltre che nei macrofagi, anche nelle cellule tumorali a livello cutaneo (in un caso di TVT primario extragenitale [Albanese *et al.*, 2002]) ed a livello di mucosa oro-nasale (Levy *et al.*, 2006); suggerendo anche l'ipotesi di un'origine reticolo-istiocitaria del tumore stesso. Risultano possibili anche la trasmissione attraverso le trasfusioni di sangue - tanto nell'uomo (Dey e Singh, 2006) quanto nel cane (de Freitas *et al.*, 2006) - e, nella specie umana, una forma di leishmaniosi, estremamente rara, acquisita in laboratorio durante la manipolazione di *inoculi* contenenti ingenti cariche parassitarie (Herwaldt, 2001), nonché quella acquisita tramite lo scambio di siringhe infette da parte dei tossicodipendenti, soprattutto se HIV positivi (Amela *et al.*, 1996).

⁸ Il TVT è una neoplasia propria del cane, ad insorgenza naturale e caratterizzato dalla peculiare modalità di trasmissione, che avviene tramite l'impianto di cellule tumorali, solitamente dagli organi genitali (pene o vagina) alla mucosa della cavità orale e nasale (Knapp *et al.*, 2002).

2.2. Eziologia

2.2.1. Leishmania

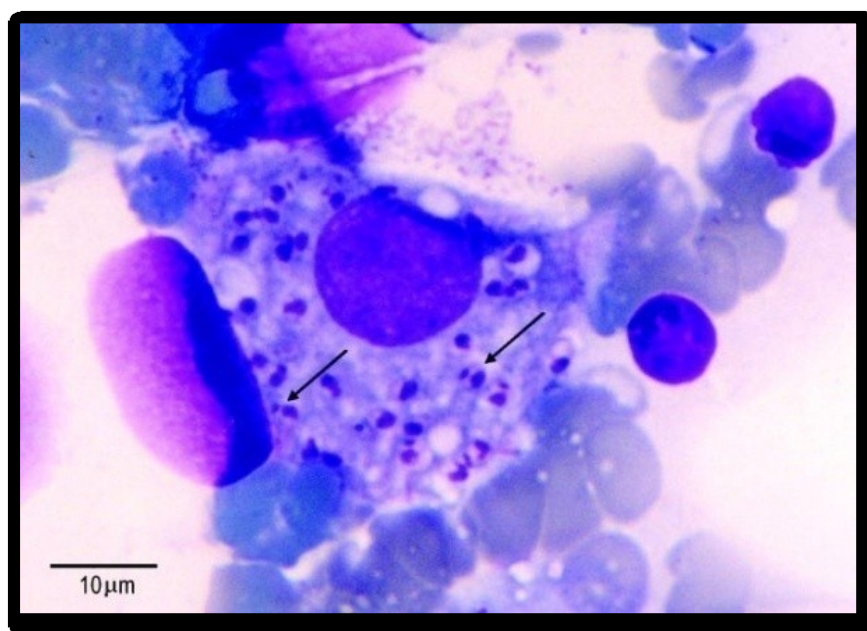
I protozoi flagellati del genere *Leishmania* (Ross, 1903) appartengono al phylum *Sarcomastigophora*, sub phylum *Mastigophora*, classe *Zoomastigophorea*, ordine *Kinetoplastida*, sottordine *Trypanosomatinae*, famiglia *Trypanosomatidae*. La classificazione è stata a lungo problematica per l'estrema difficoltà di differenziare le diverse specie in base a caratteri morfologici, per cui sono state utilizzate varie tecniche come quelle basate sugli iso-enzimi, sul DNA, sugli anticorpi monoclonali, sulle strutture di membrana e sull'analisi degli acidi grassi. La tecnica attualmente più utilizzata si basa sull'analisi elettroforetica degli iso-enzimi: un profilo enzimatico è definito allorché permette la determinazione di unità di *Leishmania* dette "zimodemi".

Nel Vecchio Mondo *L. infantum* è l'agente eziologico della leishmaniosi canina e della leishmaniosi umana (viscerale e cutanea)⁹, *L. tropica* della leishmaniosi canina e della leishmaniosi cutanea umana. Nel Nuovo Mondo *L. chagasi* (*L. infantum*) determina la malattia canina e la forma viscerale umana, mentre *L. mexicana* induce la forma cutanea umana (l'infezione canina da parte di quest'ultima pare sia asintomatica). *L. braziliensis* è l'agente eziologico della leishmaniosi umana cutanea e muco-cutanea (Tabella 1) (Roze, 2005). È interessante notare che l'analisi comparativa del genoma di *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis* ha permesso di evidenziare solo minime differenze della sequenza e dell'organizzazione genetica, tra le diverse specie ed anche tra i diversi stadi (amastigoti e promastigoti) della stessa specie, nonostante le divergenze evolutive di 15-50 milioni di anni: tra le tre specie si ha una conservazione di circa il 99% del genoma, con solamente circa 200 geni specie-specifici. È probabile che l'estrema differenza che invece si realizza, quanto a forme patologiche ed a tropismo tissutale, sia dovuta proprio all'espressione di questa esigua parte del genoma (Lynn e McMaster, 2008).

⁹ In Olanda è stato segnalato un raro caso di leishmaniosi mucosa a livello della cavità orale (palato), in cui l'agente era *L. infantum* (Van Damme *et al.*, 2004).

Tabella 1 - Le specie di *Leishmania* che causano la malattia nel cane e nell'uomo (Roze, 2005).

	Vettore	Cane	Uomo
Vecchio Mondo:			
<i>Leishmania infantum</i>	<i>Phlebotomus</i>	Malattia sistemica	Malattia viscerale e cutanea
<i>Leishmania tropica</i>	<i>Phlebotomus</i>	Malattia sistemica	Malattia cutanea
Nuovo Mondo:			
Sud America			
<i>Leishmania chagasi</i> (= <i>L. infantum</i>)	<i>Lutzomyia</i>	Malattia sistemica	Malattia viscerale
<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>Lutzomyia</i>	Malattia muco-cutanea	Malattia muco-cutanea
<i>Leishmania mexicana</i>	<i>Lutzomyia</i>	Asintomatica	Malattia cutanea
Nord America			
<i>Leishmania infantum</i>	Nessun vettore provato	Malattia sistemica	Non riportata

Figura 2 - Amastigoti di *Leishmania* (freccie) in paziente umano (Mandell *et al.*, 2005).

Le leishmanie sono microrganismi dixeni¹⁰ e dimorfici, ritrovandosi in forma di amastigote nell'ospite definitivo, di promastigoti e paramastigoti nel tratto digestivo del vettore (Kamhawi, 2002). Gli amastigoti (Figura 2, Figura 3) appaiono come

¹⁰ Necessitano di un vettore ciclico, costituito da un insetto ematofago, e di un ospite vertebrato.

corpiccioli ovoidali o rotondi (di circa $2 \times 5 \mu\text{m}$) e si localizzano e moltiplicano all'interno dei fagolisosomi delle cellule fagocitarie mononucleate dei mammiferi; presentano un nucleo relativamente grande e disposto eccentricamente, un cinetoplasto (dalla struttura simil-mitocondriale, contenente una certa quantità di DNA extranucleare, disposto in una serie di diverse migliaia di mini-circoli e 20-50 maxi-circoli) alla base della tasca flagellare ed un residuo del flagello che in estensione non arriva alla superficie esterna (Pearson *et al.*, 2001). Sono piuttosto facili da riconoscere negli strisci colorati ottenuti da biopsie midollari o linfonodali per ago-aspirazione. I promastigoti (Figura 3) sono cellule allungate flagellate ($5-20 \times 1-4 \mu\text{m}$) che contengono un nucleo ed un cinetoplasto, sono mobili e vivono in sede extracellulare in genere adesi alla parete intestinale dell'insetto vettore (Roze, 2005). Il flagello è singolo, spesso più lungo del corpo e si estende dalla tasca flagellare in corrispondenza del polo anteriore permettendo movimenti in avanti (Pearson *et al.*, 2001). Alcuni promastigoti, ad ondate successive, regrediscono a promastigoti metaciclici (infettanti) o paramastigoti e migrano verso la proboscide del flebotomo (Puccini, 1992).

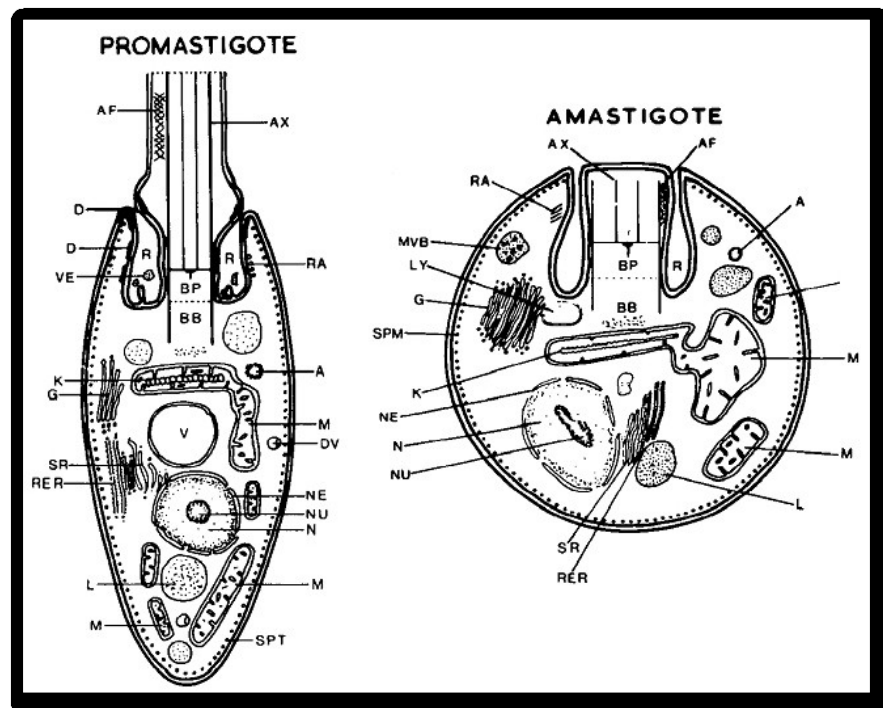


Figura 3 - Rappresentazione schematica della struttura di un promastigote e di un amastigote. A = acantosoma; AF = filamento accessorio; AX = assonema; BB = corpo basale; BP = lamina basale; D = desmosoma; DV = vescicola inclusa densa; G = apparato di Golgi; I = invaginazione; K = cinetoplasto; L = lipide; LY = lisosoma; M = mitocondrio; MVB = corpo multivescicolato; MT = microtubuli sottopellicolari; N = nucleo; NE = membrana nucleare; NU = nucleolo; R = tasca flagellare; RA = microtubuli associati alla tasca flagellare; RER = reticolo endoplasmatico rugoso; SC = strato superficiale; SPM = microtubuli sottopellicolari; SR = reticolo liscio; V = vacuolo associato al nucleo; VE = vescicola (Bray, 1974).

Dal punto di vista biochimico-molecolare, *Leishmania* è un organismo eucariotico con 36 cromosomi, che caratterizzano tutte le specie, anche se con differenze morfologiche. A differenza dell'ospite mammifero, il parassita non può sintetizzare i nucleosidi purinici e per ottenerli sfrutta una via particolare: converte l'adenosina e l'inosina in una molecola comune intermedia, l'ipoxantina, quindi sintetizza le purine. Si ha la sintesi preferenziale di nucleotidi guaninici, come indicato dall'alto rapporto guanosina/adenosina. Un'altra importante differenza tra *Leishmania* ed i mammiferi è che l'ipoxantina-guanina fosforibosil-transferasi parassitaria può utilizzare analoghi della xantina, come l'allopurinolo, come substrati. *Leishmania* possiede invece vie metaboliche specifiche per la sintesi delle pirimidine. Gli amastigoti sono adattati alla sopravvivenza all'ambiente acido dei fagosomi all'interno dei macrofagi, mentre i promastigoti si sviluppano in sede extracellulare nel canale intestinale del flebotomo. Responsabile del mantenimento del pH intracellulare è un'ATP-asi traslocante-protonica a livello della membrana. L'assunzione di aminoacidi e glucosio è accoppiata alla pompa protonica. Un tempo si riteneva che il glucosio fosse il substrato principale per il metabolismo, ma *Leishmania* cresce anche senza questo zucchero che viene fornito da aminoacidi come la prolina e la glutamina. Essi sono deaminati ed il carbonio è utilizzato dalla via degli acidi tricarbossilici. Anche gli acidi grassi sono importanti substrati. Come i tripanosomi, *Leishmania* ha un glicosoma che contiene enzimi coinvolti nella via glicolitica, nel metabolismo del glicerolo, nella fissazione dell'anidride carbonica, nella β -ossidazione degli acidi grassi e nella sintesi dei lipidi eteri (Pearson *et al.*, 2001).

2.2.1.1. *Biologia di Leishmania nel flebotomo vettore*

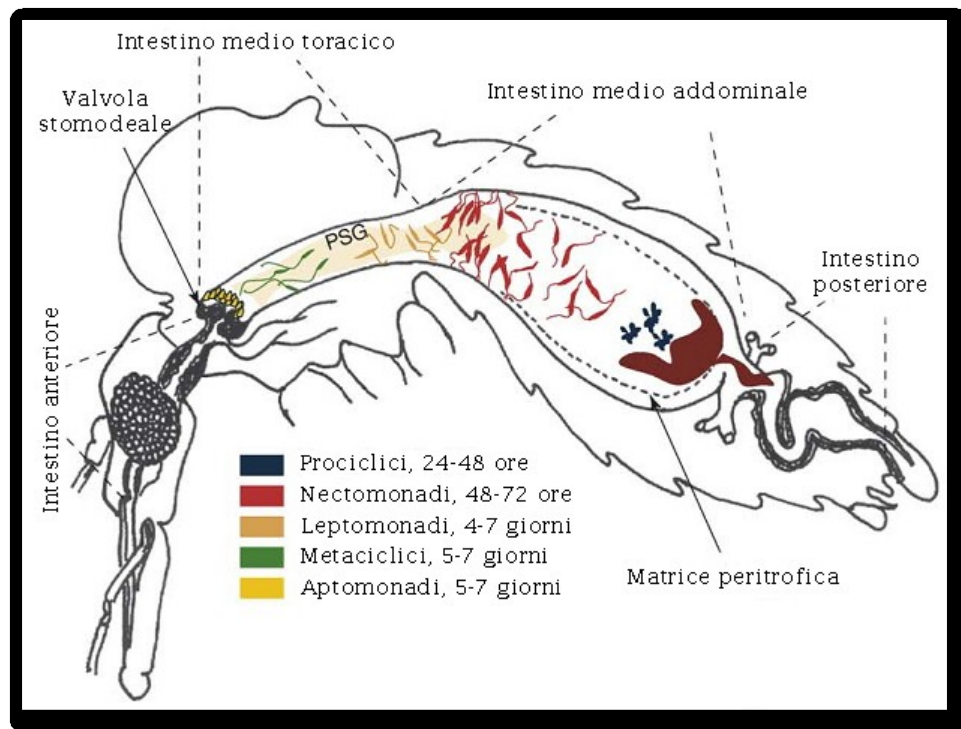


Figura 4 - Ciclo biologico di *Leishmania* nel flebotomo: morfologia temporale dei promastigoti all'interno dell'intestino (Kamhawi, 2006).

Quando una femmina di flebotomo compie un pasto di sangue su un tessuto infetto del mammifero ospite, ingerisce gli amastigoti che passano direttamente nella parte addominale dell'intestino medio (Kamhawi, 2002). Il sangue stimola le cellule intestinali a secernere una matrice proteica chitinosa detta membrana o matrice peritrofica che avvolge il pasto di sangue entro 4 ore (Blackburn, 1988) ed è completamente formata entro le 24 ore successive al pasto stesso. Questa membrana protegge l'epitelio dell'intestino dal contenuto del pasto di sangue (materiali abrasivi e microbi) ed agisce da barriera regolando e rallentando la diffusione degli enzimi digestivi (in particolare le proteasi) secreti dalle cellule epiteliali (Pimenta *et al.*, 1997). La digestione del pasto si conclude in 4-5 giorni, dopo di che i residui non digeriti vengono escreti. Per completare con successo il ciclo biologico nel flebotomo, *Leishmania* deve resistere agli enzimi digestivi¹¹, deve evitare l'espulsione dall'intestino (a questo scopo produce un peptide mio-inibitorio che determina una

¹¹ Le proteasi secrete dall'epitelio intestinale creano all'interno della matrice peritrofica un ambiente "ostile" per i promastigoti: fino al 50% dei promastigoti di *L. major* nel *Ph. papatasi* vengono uccisi entro 2 giorni dal pasto di sangue. Alcune specie di *Leishmania* hanno sviluppato dei meccanismi per ritardare o diminuire il picco degli enzimi digestivi (Kamhawi, 2006).

discreta distensione intestinale [reversibile], prevenendo anche la digestione della matrice peritrofica [Vaidyanathan, 2004]) e, nell'ultimo stadio, deve migrare anteriormente, distaccandosi dall'epitelio intestinale per la trasmissione all'ospite mammifero. Per ottenere tutto ciò, il parassita va incontro a diverse fasi di sviluppo, ognuna delle quali è adattata a superare una o più di queste barriere. Entro 24 ore dall'ingestione del pasto di sangue infetto, gli amastigoti si trasformano in promastigoti corti ed ovoidali detti prociclici. Queste forme si dividono attivamente nell'intestino medio addominale formando delle rosette che si muovono per inerzia all'interno del sangue. 2-3 giorni dopo il pasto, i promastigoti prociclici si trasformano in strutture più grandi e slanciate dette nectomonadi. Queste si moltiplicano rapidamente e si localizzano nella parte anteriore dell'intestino medio addominale. 3 giorni dopo il pasto di sangue, la membrana peritrofica inizia a distruggersi sotto l'azione di una chitinasi secreta dal flebotomo (Kamhawi, 2002), ma anche ad opera di una chitinasi parassitaria che accelera il processo di fuoriuscita dei nectomonadi nel lume intestinale (Schlein, 1991). Questi promastigoti aderiscono saldamente alla superficie dell'epitelio intestinale che li protegge dall'escrezione insieme al materiale ematico indigerito, e continuano a dividersi rapidamente durante la migrazione anteriore verso l'intestino medio toracico. 5-6 giorni dopo il pasto, questo risulta completamente digerito ed i nectomonadi iniziano a differenziarsi in due forme principali, gli aptomonadi ed i metaciclici. Gli aptomonadi sono organismi altamente specializzati che appaiono solo nell'area della valvola stomodeale (che è unita all'intestino anteriore), aderiscono alla sua superficie cuticolare e con questa formano una sorta di "tappo" che appare costituito da parassiti uniti da una matrice gelatinosa. È probabile che questo tappo blocchi la via alimentare ed interferisca con le pompe del faringe e del *cibarium* e quindi è resa difficoltosa l'assunzione di sangue da parte del flebotomo (Kamhawi, 2002). Questa difficoltà incrementa le possibilità di trasmissione dei promastigoti metaciclici. Schlein e coll. (1991) hanno dimostrato che una chitinasi prodotta dal parassita danneggia la chitina della superficie cuticolare della valvola stomodeale, opponendosi ai meccanismi di *feeding* e contribuendo a facilitare la trasmissione. I promastigoti metaciclici sono mobili e liberi e si accumulano appena dietro la valvola stomodeale, in posizione ideale per essere rigurgitati dall'apparato buccale del flebotomo, in occasione del successivo pasto di sangue. È probabile che i promastigoti infettanti non siano solo quelli situati a livello della proboscide, ma anche altri, più posteriori, situati a livello dell'intestino anteriore,

da cui vengono rigurgitati direttamente - e quindi più rapidamente - nel sito di puntura (Killick-Kendrick e Rioux, 2002). L'intero ciclo di sviluppo da amastigoti a promastigoti metaciclici richiede 1-2 settimane a seconda della specie di *Leishmania* (Pearson *et al.*, 2001).

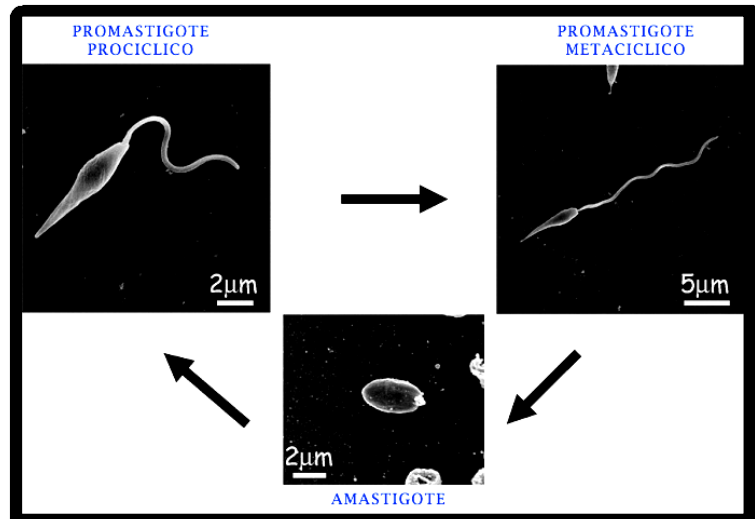


Figura 6 - Modificazioni morfologiche di *Leishmania* nel flebotomo (Besteiro *et al.*, 2007).

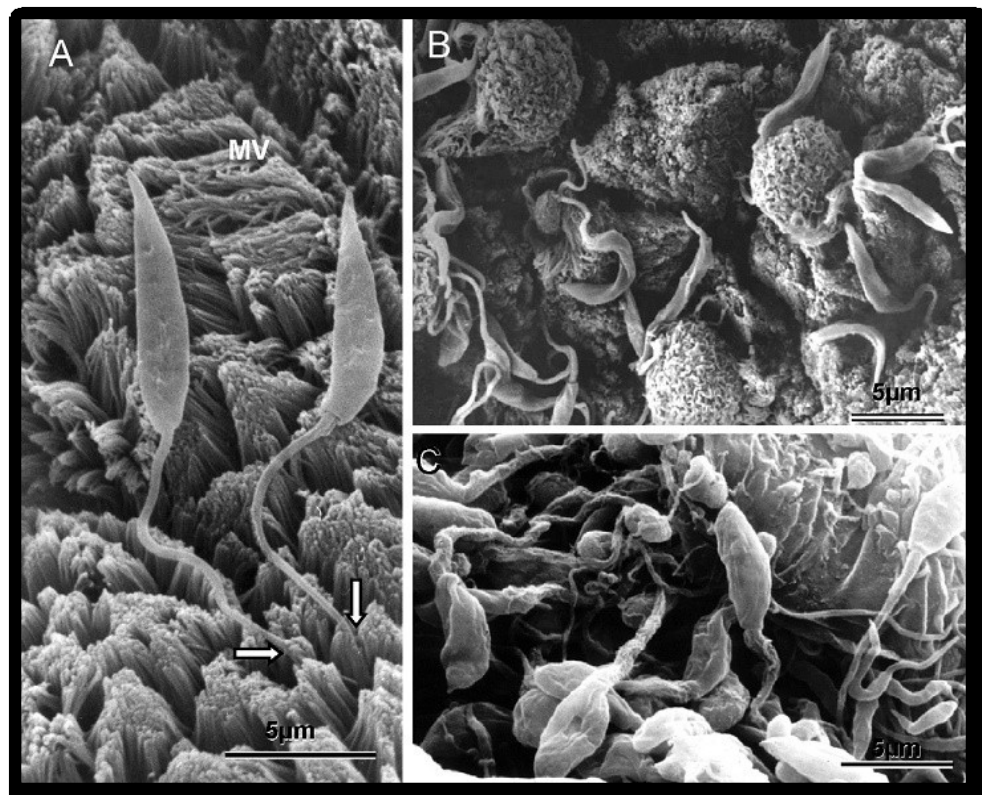


Figura 5 - Il lume intestinale di una femmina di *Ph. papatasi* è rivestito da epitelio con microvilli (MV) a cui i promastigoti (*L. major*) si ancorano con l'estremità flagellare libera (freccie) (A). Frequentemente le cellule epiteliali divengono rotonde e si liberano nel lume così che i promastigoti tendono ad occupare gli spazi lasciati liberi ancorandosi direttamente alla parete (B). A livello della valvola stomodeale la morfologia dei promastigoti cambia, assumendo un aspetto "flaccido" (C). MES (Warburg, 2008).

2.2.1.2. *Trasmissione al mammifero ospite*

L'obiettivo ultimo dell'infezione nel flebotomo è lo sviluppo dei promastigoti metaciclici che sono fondamentali per la trasmissione dell'infezione, in quanto presentano alcune caratteristiche fondamentali: libertà di movimento, perdita dell'agglutinazione con lectine specifiche, resistenza alla lisi mediata dal complemento ed al processo di *killing* macrofagico; si tratta di adattamenti funzionali per la trasmissione e la sopravvivenza nell'ospite mammifero. La differenziazione dei promastigoti nectomonadi in metaciclici, dipende soprattutto dai cambiamenti strutturali del lipofosfoglicano (LPG), la cui molecola si allunga di 2-3 volte per l'aumento dei legami disaccaridici fosforilati. Questi cambiamenti hanno implicazioni funzionali: l'allungamento del LPG è associato alla resistenza al complemento e ad un certo grado di alterazione della sua configurazione spaziale, così che gli zuccheri terminali non risultano più esposti e quindi viene perduto il legame coi recettori dell'apparato digerente del flebotomo. Il conseguente distacco dei promastigoti metaciclici però non è sufficiente per il successo della trasmissione, alla quale concorre la simultanea formazione del "tappo" biologico di natura gelatinosa, formato dagli stessi parassiti e dai fosfoglicani secreti (PSG¹²), che aumenta il lume intestinale prossimale di 2-3 volte, lasciando aperta la valvola stomodeale; si realizza un'interferenza col pasto di sangue¹³, aumentando la possibilità della deposizione dei promastigoti metaciclici (molto più mobili delle forme precedenti, seppure in fase stazionaria di crescita) nel sito di puntura (Kamhawi, 2002). Inoltre Schlein e coll. (1992) hanno dimostrato una degenerazione della valvola stomodeale nel *Ph. papatasi* infetto da *L. major*, suggerendo che questo contribuisca al deterioramento della funzione connessa al pasto di sangue. Questa difficoltà fa sì che i flebotomi si alimentino più frequentemente e/o più a lungo, accrescendo ancora di più la possibilità della trasmissione, che avviene durante i tentativi di compiere il pasto, sia con successo che senza (Hud, 2003). Inoltre il PSG viene rigurgitato insieme ai promastigoti metaciclici nel sito della puntura e contribuisce all'infettività dei parassiti ed allo sviluppo della lesione (Poulin, 2002).

¹² Promastigote Secretory Gel.

¹³ Si tratta della cosiddetta *blocked fly hypothesis* (Hurd, 2003).

L'interazione tra il parassita e le molecole del flebotomo si estende anche oltre l'insetto, ai primi eventi che si realizzano a livello del derma dell'ospite mammifero. Nella soluzione di continuo dermica, insieme ai promastigoti metaciclici, il flebotomo "inietta" anche la propria saliva, la quale contiene un insieme di molecole farmacologicamente attive che inducono vasodilatazione e prevengono la coagulazione del sangue (Ribeiro, 1995). Inoltre le molecole salivari hanno proprietà immunomodulatorie che alterano la risposta dell'ospite all'infezione e potenzialmente anche l'esordio della malattia (Kamhawi, 2000). È stato dimostrato che la saliva del flebotomo aggrava le infezioni da *Leishmania*, producendo lesioni più ampie e/o determinando un incremento delle cariche parassitarie (Mbow *et al.*, 1998). Questo può essere dovuto ad un effetto inibitorio sulle funzioni macrofagiche, tra cui la presentazione antigenica, la produzione di ossido nitrico (NO) e l'induzione della proliferazione dei linfociti T indotta dal parassita (Hall e Titus, 1995). Tra le molecole salivari che manifestano proprietà immunomodulatorie ci sono il maxadilano, l'adenosina, la ialuronidasi, l'adenosin-deaminasi ed il suo prodotto inosina, tutti identificati nel *Ph. papatasi* e/o *Ph. sergenti* e/o *Lu. longipalpis* (Kamhawi, 2000; Rohousová *et al.*, 2005). Il maxadilano, il vasodilatatore di *Lu. longipalpis*, inibisce l'attivazione dei linfociti T, le risposte d'ipersensibilità ritardata (DTH) e la citochina pro-infiammatoria TNF- α , mentre induce la produzione di IL-6, IL-10 e prostaglandina E₂ (Soares *et al.*, 1998). L'adenosina, il vasodilatatore di *Ph. Papatasi*, ha proprietà anti-infiammatorie ed inibisce IL-12, IFN- γ , TNF- α e NO, mentre stimola la produzione di IL-10 (Haskó *et al.* 1996; 1998). La ialuronidasi inibisce l'IFN- γ mentre stimola l'espressione genetica della chemochina e di iNOS (Horton *et al.*, 1998). L'adenosin-deaminasi previene l'apoptosi dei linfociti T, mentre l'inosina inibisce IL-12 e IFN- γ . Comunque sia, fatta eccezione per il maxadilano che aggrava l'infezione nel topo, gli effetti specifici delle suddette molecole salivari immunomodulatorie sullo sviluppo del parassita nel proprio ospite mammifero, non sono ancora ben chiari (Kamhawi, 2002).

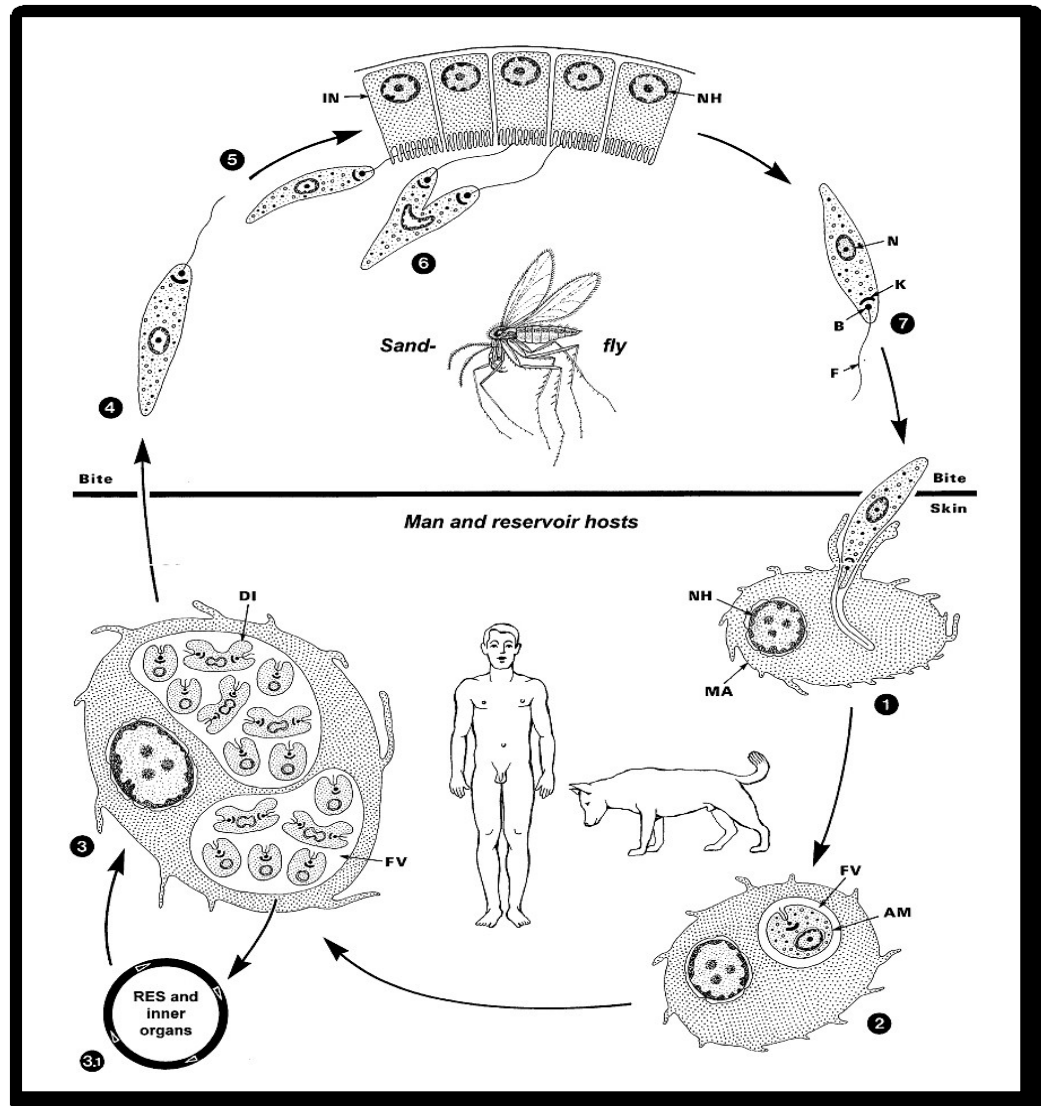


Figura 7 - Schema riassuntivo del ciclo biologico di *Leishmania*. (1) In seguito alla puntura del flebotomo, i promastigoti vengono inglobati dai macrofagi dell'ospite. (2) Trasformazione dei promastigoti in amastigoti (1-4 ore) e divisione per scissione binaria. (3) "Scoppio" dei macrofagi che liberano gli amastigoti. (3.1) Diffusione degli amastigoti alle cellule del sistema reticolo-istocitario ed agli organi interni. (4-5) Dopo l'ingestione degli amastigoti da parte del flebotomo, i parassiti si trasformano in promastigoti che si moltiplicano per divisione binaria (6) e si "agganciano" all'epitelio dell'intestino dell'insetto, per poi migrare a livello orale e faringeo pronti per la trasmissione (7). AM, amastigote; B, corpo basale del flagello; DI, stadio di divisione; F, flagello libero; FV, vacuolo parassitario; IN, cellula intestinale; K, cinetoplasto; MA, macrofagi; N, nucleo; NH, nucleo della cellula ospite (Mehlhorn, 2008).

2.2.2. Il flebotomo

Delle circa 800 specie e sottospecie di flebotomi, 80 sono i vettori accertati o probabili delle 22 specie di *Leishmania* che causano la malattia nell'uomo. In alcuni focolai di leishmaniosi non si conosce il vettore ed è molto probabile che altre specie dovranno essere aggiunte alla lista. Con l'esclusione di *Lu. longipalpis* del Nuovo Mondo e *Ph. papatasi*, *Ph. ariasi* e *Ph. perniciosus* del Vecchio Mondo, la biologia

della maggior parte di questi vettori è poco conosciuta. Questo si traduce in una chiara limitazione nella ricerca dei mezzi per il controllo dei vettori e dunque nella riduzione del rischio d'infezione (Killick-Kendrick, 2002).



Figura 8 - *Phlebotomus papatasi* adulto (Mehlhorn, 2008).

I flebotomi sono classificati nel sottordine *Nematocera*, ordine *Diptera*. Sotto a questo la classificazione non è universalmente riconosciuta, ma sono generalmente inseriti nella famiglia *Psychodidae*, sottofamiglia *Phlebotominae*. Tutti i vettori provati di *Leishmania* appartengono a due soli generi: *Phlebotomus* e

Lutzomyia. I moderni approcci alla tassonomia ed alla sistematica dei flebotomi includono: analisi isoenzimatiche, tassonomia numerica, analisi multivariate delle caratteristiche morfologiche, sequenziamento del DNA (id). Questi insetti hanno corpo piccolo (2-3 mm di lunghezza), di colore giallo pallido o giallo-ruggine, coperto di lunghi e fitti peli; il torace e l'addome formano un angolo quasi retto, molto caratteristico; testa allungata ed inserita sul collo formando un angolo di 45°; occhi voluminosi, composti, di colore scuro, situati ai lati della testa (appaiono lateralmente rotondeggianti e superiormente reniformi); palpi pelosi e ricurvi; lunghe antenne (costituite da 16 segmenti); ali grandi, pelose, di forma sub-ovale o lanceolata, con numerosi vasi paralleli, portate erette sopra il corpo in modo caratteristico a disegnare una V; zampe lunghe e sottili. Le strutture buccali della femmina, atte a pungere, sono costituite da un labbro-epifaringe ventralmente scanalato e denticolato alla sua estremità; un'ipofaringe che porta il dotto salivare; due mandibole con estremità seghettata; due mascelle a forma di lama. In condizioni di riposo questo apparato è contenuto nel labbro inferiore. Il maschio si distingue per avere un apparato buccale meno sviluppato (mancano le mandibole), ma soprattutto per la presenza di lunghi genitali esterni (un paio di appendici in corrispondenza della punta dell'addome). Le larve, allungate, vermiformi e di colore grigio (molto difficili da identificare), hanno una capsula ben sclerotizzata a livello della testa (più scura del corpo) ed un apparato buccale masticatore (si nutrono di detriti organici e relativi microrganismi); il corpo è

formato da 12 segmenti (quelli addominali si distinguono da quelli toracici per la presenza ventrale di pseudopodi) coperti di corti peli e termina con delle setole lunghe quanto l'intero corpo (proprie anche della pupa) (Casarosa, 1985[2]; Lehane, 2005; Mehlhorn, 2008).

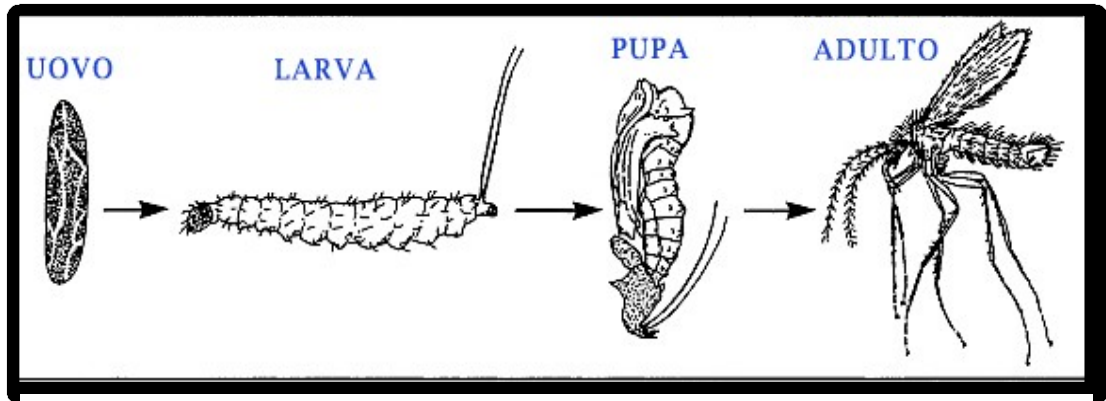


Figura 9 - Morfologia delle 4 fasi di sviluppo dei flebotomi (Mehlhorn, 2008).

2.2.2.1. *Biologia*

La distribuzione dei flebotomi si estende a nord appena sopra i 50°N nel sud-ovest del Canada ed appena al di sotto di questa latitudine nel nord della Francia e della Mongolia. A sud arriva circa ai 40°S di latitudine, ma questi insetti risultano assenti dalla Nuova Zelanda e dalle isole del Pacifico. Come altitudine la distribuzione va da sotto il livello del mare (come nella zona del Mar Morto) a 3.300 metri sopra il livello del mare in Afghanistan (*Ph. rupester*) (Killick-Kendrick, 2002).

La femmina di flebotomo si nutre di sangue per la maturazione delle uova¹⁴, mentre il maschio non punge. Le femmine di alcune popolazioni sono autogene e depongono le prime uova senza avere compiuto un pasto di sangue. Il tempo che intercorre tra il pasto di sangue e la maturazione delle uova, si aggira intorno a 4-8 giorni. I batteri del terreno attraggono le femmine di *Ph. papatasi* gravide (Radjame *et al.*, 1997) ed anche la presenza di uova conspecifiche agisce in senso attrattivo o stimolante l'ovodeposizione. Il feromone responsabile di questa attrazione è stato isolato dalle uova di *Lu. longipalpis* (Dougherty *et al.*, 1994) e risulta essere prodotto dalle ghiandole accessorie della femmina. I soggetti gravidi di *Lu. longipalpis* sono attratti anche dall'esano e dal 2-metil-2-butanolo presenti nelle feci dei polli e dei

¹⁴ Vengono deposte 30-70 uova (di 0,3 mm di lunghezza e 0,1 mm di larghezza) in siti relativamente caldi ed umidi, come le tane dei roditori o i ricoveri degli animali (Mehlhorn, 2008).

conigli. Gli stadi di sviluppo pre-imaginali sono terrestri. Dopo uno sviluppo embrionale di 1-2 settimane, ha inizio il primo stadio larvale dei 4 totali. Le specie paleartiche al quarto stadio larvale vanno in diapausa invernale, mentre alcune specie tropicali sopravvivono alle abbondanti piogge in diapausa allo stadio di uova. I siti di sviluppo delle larve sono ricchi di materiale organico e debbono conservare una discreta umidità¹⁵ durante tutti gli stadi. In laboratorio il tempo di sviluppo che intercorre dall'uovo alla pupa è di 4 settimane o più, a seconda della specie e della temperatura, e lo sviluppo delle pupe sessili richiede circa 10 giorni. L'adulto emerge dalla pupa durante la notte e la femmina vive circa 14 giorni. L'intero ciclo biologico (uovo - uovo) richiede da 20 a 50 giorni (ma fino a molti mesi per le specie in diapausa) (Killick-Kendrick, 2002; Mehlhorn, 2008).

Alcune specie di flebotomi si accoppiano sull'ospite, su cui in genere si posa per primo il maschio ed il riconoscimento per l'accoppiamento avviene per la produzione di feromoni maschili¹⁶, suoni (prodotti dalle ali) e, in una specie - *Ph. dubosqi* - allorché il maschio sale sul dorso della femmina. L'accoppiamento può avvenire indifferentemente prima, durante o dopo il pasto di sangue e più di una volta per ogni singolo ciclo genotrofico. La preferenza dell'ospite da parte della femmina varia da specie a specie: alcune si alimentano su un solo ospite (es.: sui pipistrelli [*Lu. vespertilionis*]), altre in un *range* di ospiti molto ristretto (es.: bovidi e uomo [*Ph. argentipes*]), altre su tutti i mammiferi (es.: *Ph. ariasi*), altre ancora su mammiferi, uccelli e rettili (*Ph. papatasi*). Come avviene anche per altri nematoceri, i flebotomi adulti di entrambi i sessi si alimentano di fonti naturali di zuccheri, come la melata degli afidi ed i succhi dei frutti; una specie (*Ph. papatasi*) si nutre anche della linfa delle piante (Killick-Kendrick, 2002). Attraverso studi sperimentali e di campo riguardanti l'infezione da *L. major* nel *Ph. papatasi* in Giordania, è stato notato che alcune sostanze vegetali che fanno parte della dieta dei flebotomi, danneggiano la vitalità dei parassiti, diminuendo sensibilmente il tasso d'infezione: mentre il patogeno appare protetto finché resta all'interno della matrice peritrofica, una volta che questa è stata digerita, risulta esposto all'azione delle sostanze vegetali. Anche se non sono

¹⁵ 75% (Lehane, 2005).

¹⁶ I feromoni sessuali di *Lu. longipalpis* sono dei terpeni prodotti dalle ghiandole maschili situate sotto la cuticola dei segmenti addominali 3 e 4; in laboratorio attraggono le femmine conspecifiche entro 2 metri di distanza e probabilmente a distanze superiori sul campo, dove gli odori dell'ospite potenziano l'attrazione dei feromoni stessi (Maingon *et al.*, 2008).

state identificate le sostanze che determinano questo danneggiamento, le lectine potrebbero avere un ruolo nel determinare l'agglutinazione dei parassiti. È stato rilevato che l'alimentazione prevalente a base di ricino (*Ricinus communis*), morella rossa (*Solanum luteum*) e capperio (*Capparis spinosa*), induce un danneggiamento dei parassiti dell'88%, 46% e 5% rispettivamente (Schlein e Jacobson, 1994). La specie maggiormente presente in Italia (*Ph. perniciosus*) risulta molto adattabile (*opportunistic feeder*), per cui può alimentarsi su molte specie diverse di mammiferi e non (uomo, cane, coniglio, pecora, uccelli), in relazione alla presenza prevalente di certi ospiti piuttosto che di altri. Questo fatto può avere importanti ripercussioni sull'epidemiologia della leishmaniosi, in quanto nelle aree urbane e periurbane, mancando altri ospiti mammiferi (in particolare quelli di grossa mole), *Ph. perniciosus* può adattarsi a pungere l'uomo ed il cane più frequentemente (Rossi *et al.*, 2008).

Durante il giorno i flebotomi restano a riposo in diversi siti: abitazioni, latrine, cantine, stalle, pollai, canili, ovili, conigliere, grotte; fessure dei muri, delle rocce, del terreno, degli alberi o dei pali; fitta vegetazione, tane di roditori e di altri mammiferi, nidi di uccelli e formicai. L'attività degli adulti è crepuscolare e notturna - benché alcune specie della foresta neotropicale possano pungere anche durante il giorno - con un picco che in genere si realizza subito dopo il tramonto. Nell'attrazione dei flebotomi verso le proprie vittime, un ruolo importante è svolto dai kairomoni (feromoni) e, in misura minore, dalla CO₂ (Killick-Kendrick, 2002). Sembra che i flebotomi siano attratti maggiormente dai cani infetti piuttosto che dai non infetti, probabilmente per ragioni odorifere: non sarebbe il parassita in sé a modificare gli odori emessi dai soggetti infetti, ma tutte le alterazioni che si realizzano nel corso della malattia, come le lesioni cutanee, con possibili infezioni batteriche secondarie; del resto le zone che attirano di più i flebotomi risultano quelle già lesionate. Inoltre i pappataci infetti - come le zanzare infette dal plasmodio della malaria - sono più attivi nella ricerca del pasto rispetto a quelli non infetti (Poulin, 2002).

Il volo è breve (100-200 m [Mehlhorn, 2008]) e di tipo "saltellante" (Lehane, 2005), anche se la massima distanza di dispersione, evidenziata in esperimenti di campo di marcatura-rilascio-ricattura, è stata di 2,3 km: le femmine ripiene di sangue generalmente restano entro 250 m dal punto di rilascio per i primi 8 giorni, cioè durante la digestione del pasto di sangue, dopo di che tendono a disperdersi

maggiormente superando i 350 m, presumibilmente alla ricerca di siti per l'ovodeposizione o di altri ospiti su cui nutrirsi; la distanza maggiore a cui una femmina ripiena di sangue è stata trovata è risultata di 925 m (12 giorni dopo il rilascio); le femmine rilasciate senza aver compiuto il pasto, si disperdono rapidamente coprendo distanze anche di 1 km o più; i maschi invece restano nelle vicinanze, non superando mai la distanza di 600 m (Killick-Kendrick *et al.*, 1984). Il volo è estremamente silenzioso (Roze, 2005) e la velocità massima è di poco inferiore a 1 m/sec (Killick-Kendrick *et al.*, 1986).

Sono interessanti i risultati della ricerca di Rossi e coll. (2008) che ha riguardato anche il comportamento stagionale dei flebotomi in una zona collinare della provincia di Roma¹⁷ in due distinte stagioni, 2002 e 2003. È stata rilevata una notevole differenza nel numero dei soggetti catturati (644 nel 2002 e 5.024 nel 2003¹⁸) ed anche nel periodo della loro attività: 7 mesi (da maggio a novembre) nel 2003 e 5 mesi (da giugno ad ottobre) l'anno precedente. Le due differenze possono essere messe in relazione soprattutto con l'intensa piovosità che caratterizzò la stagione 2002, limitando il periodo d'attività ed il numero dei flebotomi, rispetto alla piovosità moderata della stagione successiva, più tipica dell'area bioclimatica in questione¹⁹. Un'analogia situazione è stata segnalata anche in Campania, con la stagione d'attività dei flebotomi di 2,5 mesi nel 2002 e di 5 mesi nel 2003 e 2004 (Oliva *et al.*, 2006). L'abbondanza dei flebotomi neotropici del Vecchio Mondo è invece opposta: *Lu. longipalpis* in Brasile risulta maggiormente presente in seguito alle precipitazioni, mentre scarseggia nei periodi secchi e freddi (Araujo e Silva *et al.*, 2007).

L'IMPORTANZA DELLA TEMPERATURA

La temperatura influenza significativamente i tempi di sviluppo ed altre caratteristiche del ciclo biologico degli artropodi (come la sopravvivenza degli stadi pre-imaginali e la longevità degli adulti). Inoltre, negli insetti ematofagi, la temperatura può influire sulla suscettibilità ai patogeni trasmissibili: in laboratorio, soggetti di *Ph. papatasi* mantenuti a 23 °C, mostrano tassi d'infezione da *L. major* significativamente superiori rispetto a quelli mantenuti a 28 °C (Kasap e Alten, 2005;

¹⁷ In 17 diversi paesi caratterizzati da un'altitudine sul livello del mare da 310 a 670 m.

¹⁸ Con una densità anche fino a 23 soggetti per m² per le trappole adesive notturne.

¹⁹ Già nel 1974 Lewis aveva affermato che i flebotomi del Vecchio Mondo sono più numerosi nelle zone relativamente asciutte.

Benkova e Volf, 2007). In uno studio sono stati valutati i tempi di sviluppo dei vari stadi di *Ph. papatasi*, mantenuti a 6 diversi regimi di temperatura costante (15, 18, 20, 25, 28 e 32 °C) (Kasap e Alten, 2005): a 15 °C le uova non schiudono; a 18 °C solo 8 uova su 100 (8%) raggiungono lo stadio di pupa ed emergono solo 7 adulti; alle temperature più alte, tutti i soggetti proseguono il ciclo, emergendo come adulti oppure muoiono durante l'esperimento, con tempi di sviluppo costantemente decrescenti all'aumentare della temperatura (la differenza tra 25 e 28 °C non è statisticamente significativa)²⁰. Per cui a 32 °C vengono registrati i tempi minori di sviluppo. Il tasso di schiusa massimo (72%) si ottiene a 20 °C; inoltre, a tutte le temperature, il maggior tasso di mortalità riguarda le larve, con l'esclusione della temperatura di 32 °C, a cui riguarda le uova (percentuale di sopravvivenza: 35%). Valutando le varie combinazioni di sopravvivenza e temperatura, viene stimato che la temperatura minima a cui almeno uno stadio si sviluppa, è di 17,63 °C (pupe), mentre, considerando tutto il ciclo da uova ad adulti, la temperatura minima necessaria è di 20,25 °C²¹. Risulta anche che gli stadi immaturi sono diversamente tolleranti alle temperature: le uova sono più sensibili alle alte temperature, mentre le larve alle basse; questo è probabilmente il motivo per cui le specie paleartiche vanno in diapausa invernale al 4° stadio larvale. Un altro studio ha valutato l'effetto di due diversi regimi di temperatura (23 e 28 °C) sul metabolismo di *Ph. papatasi* (Benkova e Volf, 2007). Alla temperatura più bassa, i processi metabolici sono più lenti: la defecazione, l'ovodeposizione e la schiusa delle uova, avvengono più tardi ed impiegano più tempo a raggiungere il completamento. Anche la mortalità è più bassa a 23 °C: le femmine vivono circa 2 giorni in più che a 28 °C, anche se soggetti alimentati solamente con zuccheri, hanno tempi di sopravvivenza simili (l'80% circa delle femmine vive più di 6 giorni ad entrambe le temperature). *Ph. papatasi* è una specie che si adatta molto bene ad un ampio *range* di temperature, trovandosi abbondantemente anche in aree molto aride e calde. Indubbiamente però i flebotomi liberi vivono per tempi inferiori rispetto a quelli mantenuti in laboratorio, soprattutto a causa delle condizioni

²⁰ Anche secondo i risultati di un precedente lavoro (*Ph. papatasi* e *Ph. argentipes*) risulta che, aumentando la temperatura da 20 a 31 °C, diminuiscono costantemente i tempi di sviluppo (Gosh *et al.*, 1992).

²¹ La durata massima e minima di tutto il ciclo risultano: 246,43 ± 13,83 giorni (a 18 °C; solo 7 adulti da 100 uova) e 27,89 ± 1,88 giorni (a 32 °C; 19 adulti da 100 uova); il numero massimo di adulti (38 da 100 uova) si ottiene a 28 °C (44,8 ± 11,49 giorni).

ambientali avverse²². La defecazione delle femmine mantenute a 23 °C è ritardata di 12-36 ore, rispetto alle femmine mantenute a 28 °C; tale differenza è abbastanza significativa da influire sulla suscettibilità all'infezione da *L. major*: come mostrato da Lawyer e coll. (1990), i flebotomi con digestione rapida esprimono una scarsa capacità vettoriale, in quanto i parassiti vengono espulsi dall'intestino prima che riescano a stabilire l'infezione; invece la lenta digestione che si verifica a 23 °C, dà a *L. major* il tempo sufficiente a che questa si realizzi.

²² In una zona della Giordania è stato rilevato che solo il 9% circa delle femmine (*Ph. papatasi*) vive più di 6 giorni, e che la maggior parte dei soggetti ha 2-4 giorni di vita (Schlein e Jacobson, 1999).

2.3. Patogenesi

I promastigoti metaciclici, introdotti nell'organismo del mammifero ospite, vengono attaccati dai fagociti (generalmente i macrofagi, a cui i parassiti si “agganciano” mediante l'estremità craniale flagellata o l'estremità caudale) nei quali, in un tempo piuttosto breve, passano a forme amastigote (requisito importante per lo stabilirsi dell'infezione) e si riproducono per scissione binaria²³ fino ad infarcire tutta la cellula ospite provocandone la distruzione (Corazza *et al.*, 1999). Nell'infezione umana da *L. major* è stato dimostrato che le prime cellule dell'organismo che entrano in contatto con il parassita sono i granulociti neutrofili²⁴, migrati nel sito d'infezione, i quali fagocitano il microrganismo senza ucciderlo; inoltre la loro apoptosi fisiologica risulta ritardata fino a richiedere 2 giorni. I neutrofili infetti producono una citochina che attrae i macrofagi, i quali a loro volta fagocitano i polimorfonucleati e quindi *Leishmania*, internalizzata tramite questa via indiretta, riesce a sopravvivere ed a moltiplicarsi nei macrofagi stessi; quindi il parassita utilizza i neutrofili come una sorta di “Cavallo di Troia” per penetrare nelle cellule ospiti finali in modo silente e senza essere riconosciuto (van Zandbergen *et al.*, 2004). Inoltre van Zandbergen e coll. (2006) hanno dimostrato sperimentalmente, *in vitro* ed *in vivo*, che per la sopravvivenza dei parassiti vitali è necessaria la presenza di forme parassitarie apoptotiche (caratterizzate da una forma rotondeggiante, un cinetoplasto rigonfio ed un nucleo condensato), arrivando a parlare di un comportamento dell'infezione di tipo “altruistico”, confermando precedenti osservazioni sull'apoptosi di *Leishmania*, che avevano avanzato l'ipotesi di un adattamento evolutivo sotto la pressione dell'ospite (Arnoult *et al.*, 2002). Questa fagocitosi “silente”, che interessa sia i neutrofili che i macrofagi, risulta dipendente dal riconoscimento della fosfatidilserina sulla membrana dei parassiti apoptotici, con la produzione di TGF- β , al posto delle altre citochine pro-*kill*ing (Laskay *et al.*, 2008). I neutrofili appaiono comunque importanti come cellule effettrici per un'efficace risposta immunitaria di tipo Th1, come è stato evidenziato sperimentalmente nel topo (*L. donovani*) in cui l'inibizione di queste cellule ha indotto

²³ Negli amastigoti intracellulari è stato notato anche un certo grado di fusione nucleare tra parassiti diversi e quindi è possibile anche una forma di riproduzione sessuata primordiale (Kreutzer *et al.*, 1994).

²⁴ Molto probabilmente avviene anche nel cane: in soggetti inoculati sperimentalmente per via intradermica con promastigoti di *L. infantum*, 3½ ore dopo, negli strisci delle impronte cutanee, si osservano numerosi neutrofili e solo pochi macrofagi parassitati (Santos-Gomes *et al.*, 2000).

un aumento della carica parassitaria nella milza e nel midollo osseo e, in misura minore, nel fegato; inoltre si sono avuti altri effetti, come la splenomegalia, un ritardo della maturazione dei granulomi epatici e l'aumento splenico di citochine Th2 (IL-4, IL-10) (McFarlane *et al.*, 2008).

L'attività leishmanicida del macrofago è bassa a temperatura compresa fra 30 e 35 °C; infatti nell'uomo le lesioni più gravi a livello cutaneo sono state rilevate in aree del corpo in cui la temperatura è mediamente di 30-32 °C. Inoltre i macrofagi dell'epidermide (cellule di Langerhans) non esprimono recettori CR3 e C3bi (recettori per le relative frazioni del complemento) e sembra non siano in grado di fagocitare i promastigoti; oltre a ciò, i macrofagi del derma, pur fagocitando il parassita, non sono in grado, di per sé, di produrre un efficace *burst* ossidativo (Corazza *et al.*, 1999). L'inibizione di questo meccanismo si realizza anche nei granulociti e nei monociti circolanti, attraverso una ridotta produzione di O_2^- e H_2O_2 , in seguito all'inibizione della protein chinasi C (PKC, il mediatore di eventi come il *burst* ossidativo e la produzione di IL-1) da parte di *Leishmania* (Brandonisio *et al.*, 1996). Il promastigote internalizzato nella cellula fagocitaria riesce a sopravvivere perché inibisce la maturazione fagosomiale; ed in questo una funzione cruciale è rivestita dal principale glicocongiugato di superficie del parassita, il lipofosfoglicano (LPG), tramite diversi meccanismi inibitori, come la rottura dell'actina filamentosa (F-actin) perifagosomiale durante il processo di maturazione del fagosoma stesso. Ma una delle citochine protettive (nei casi in cui l'immunità cellulomediata è prevalente), l'IFN- γ , determinando l'*up-regulation* della produzione macrofagica di NO•, favorisce questa maturazione fagosomiale e quindi l'uccisione del parassita (Winberg *et al.*, 2007). I lipofosfoglicani dei promastigoti metaciclici contengono anche molecole di acido sialico, un potente inibitore dell'attivazione della via alternativa del Complemento. Viene invece attivata la via classica in seguito alla fissazione della frazione C3 sulla superficie dei promastigoti, che ne permette l'opsonizzazione e quindi il legame coi recettori CR1 e/o CR3 del macrofago che così fagocita il parassita. Tale processo evita il contatto prolungato di *Leishmania* con anticorpi e Complemento attivato, e la penetrazione nel macrofago attraverso i detti recettori ne facilita la sopravvivenza perché l'internalizzazione mediata dai recettori è dissociata dall'attivazione del *burst* ossidativo (Corazza *et al.*, 1999). Oltre al LPG un'altra molecola della superficie del parassita è importante nel processo di attacco ai recettori dei macrofagi: una proteasi

neutra di 63 kDa, detta GP63. L'attivazione del Complemento che riguarda i promastigoti metaciclici, si verifica a distanza dalla loro parete, per cui il complesso di attacco membranario (C5b-C9) non è inserito ed il parassita non viene lisato (Pearson *et al.*, 2001). Una volta fagocitati, i promastigoti si trasformano in amastigoti all'interno del fagolisosoma, e riescono a sopravvivere al suo ambiente acido; risulta infatti che l'acquisizione di metaboliti come la prolina, il glucosio e le basi pirimidiniche, essenziali per metabolismo del parassita, è ottimale a valori di pH compresi tra 4 e 5,5 (Corazza *et al.*, 1999).

Dal sito primario cutaneo d'infezione (in cui avviene la prima moltiplicazione di *Leishmania*) il parassita, in assenza di un'efficace risposta immunitaria, può essere disseminato attraverso la via ematica e linfatica, infettando i macrofagi di midollo osseo, linfonodi, fegato, milza, reni e tratto gastro-enterico, cute, ecc. (Reis *et al.*, 2006[1]; Strauss-Ayali *et al.*, 2007). Nella leishmaniosi canina la diffusione del parassita è in genere estensiva, al contrario di quanto normalmente avviene nell'uomo, in cui risulta limitata a midollo osseo, milza e fegato; nelle coinfezioni *Leishmania*-HIV invece è più frequente la disseminazione del patogeno in vari organi, anche del tutto inusuali. La presenza di *Leishmania* in differenti tessuti ed organi determina reazioni che producono lesioni e segni caratteristici della malattia. Vengono indotte reazioni proliferative infiammatorie che sfociano in un'infiltrazione cellulare, la quale progressivamente si estende ad aree sempre più estese, causando una crescente alterazione ed uno squilibrio funzionale degli organi interessati. Si ha anche una risposta immunitaria umorale, che inizia con la stimolazione policlonale della serie dei linfociti B e che determina la produzione di alte concentrazioni di globuline γ , costituite da immunoglobuline specifiche ed aspecifiche. Inoltre, in diversi siti dell'organismo, si formano e precipitano immunocomplessi, costituiti principalmente da IgG e dalle frazioni C1, C2 e C4 del Complemento (Alvar *et al.*, 2004).

LESIONI CUTANEE

Sono comuni ed in genere dovute a vari meccanismi immunologici, ma anche all'azione diretta del parassita. In caso di resistenza, si ha una caratteristica dermatite alopecica con cellule di Langerhans e cheratinociti, che esprimono gli antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe II, cellule T, macrofagi e parassiti nel derma (id). In caso di sensibilità, appaiono lesioni nodulari senza cellule

presentanti l'antigene (APC) e molti macrofagi parassitati; il prevalere del primo o del secondo tipo di lesioni potrebbe anche avere un valore grossolanamente prognostico (Fondevila *et al.*, 1997). Nella cute sono stati osservati anche fibroblasti parassitati che possono essere importanti nello sviluppo delle ulcere (Hervás Rodríguez *et al.*, 1996).

RENI

Le lesioni sono caratterizzate da un danno glomerulare e tubulare conseguente alla risposta immunitaria (Poli *et al.*, 1991). La glomerulonefrite²⁵ acuta causa insufficienza renale (la principale causa di morte nei cani leishmaniotici [Zatelli *et al.*, 2003]) per la deposizione di immunocomplessi (Benderitter *et al.*, 1988) formati da IgG anti-*Leishmania* (Mancianti *et al.*, 1989); a livello del mesangio e delle pareti dei capillari sono stati messi in evidenza IgG, IgM e C3 (Poli *et al.*, 1991). Lo squilibrio della funzionalità renale è associato alle alte concentrazioni di immunocomplessi circolanti: i cani con infezione definita, ma con risposta umorale lieve od assente, non tendono a sviluppare lesioni renali. La presenza in questo contesto di cellule T suggerisce il coinvolgimento della risposta cellulomediata nella glomerulonefrite immuno-indotta (Alvar *et al.*, 2004). Dal punto di vista istologico la glomerulonefrite (GN) - sia nel cane che nell'uomo, benché le diverse forme si presentino con frequenze differenti - può essere classificata in: membranosa (MmGN), membranoproliferativa (MpGN), mesangiale (MGN) e segmentale focale (FSGN). In letteratura, nell'ambito della specie canina, vengono riportate frequenze e prevalenze diverse per i vari *pattern* istologici. La stessa cosa vale per le lesioni tubulointerstiziali croniche che, in alcuni lavori sono sempre evidenti ed in altri non sempre (Zatelli *et al.*, 2003). Possono essere presenti anche depositi di sostanza amiloide, sia a livello glomerulare che interstiziale (Poli *et al.*, 1991). Un'interessante segnalazione (Figura 10) riguarda la presenza di una MpGN di tipo III, in una femmina di Pastore Tedesco di 9 anni, con infestazione simultanea *Leishmania-Dirofilaria immitis*: la membrana basale glomerulare appariva ispessita ed interessata da una diffusa ipercellularità, con una componente formata dalla frazione C3 del Complemento ed IgG; inoltre era presente anche una discreta nefrite interstiziale (Aresu *et al.*, 2007). La componente maggiore che causa il danno glomerulare è rappresentata dalla deposizione di immunocomplessi,

²⁵ La glomerulonefrite è presente in quasi tutti i cani leishmaniotici: in uno studio è stata rilevata in 55 su 55 cani esaminati; la nefrite interstiziale nel 78% di essi (Costa *et al.*, 2003).

anche se in certi casi la scarsità di antigene rilevato ed il tipo di infiltrato non correlano molto bene con questo assunto; infatti, oltre ad antigeni di *Leishmania*, è possibile rinvenire degli infiltrati costituiti da linfociti T CD4+ a livello glomerulare ed interstiziale; tali cellule potrebbero rivestire un ruolo nella patogenesi delle lesioni renali (Costa *et al.*, 2000). Nei preparati istologici di biopsie renali è possibile il rinvenimento di amastigoti (Figura 11, Soares *et al.*, 2005).

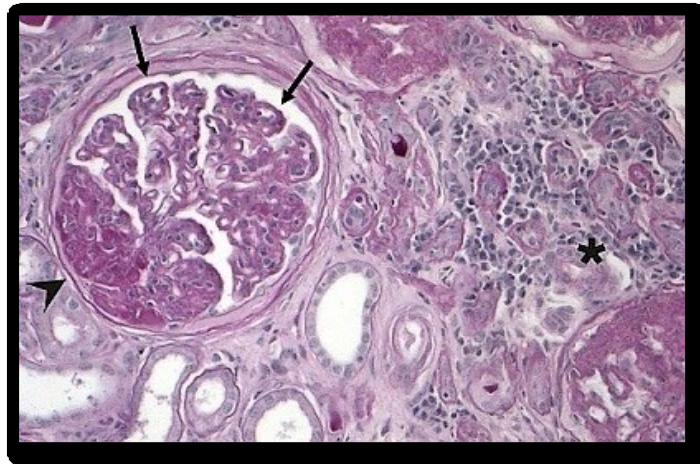


Figura 10 - Ispessimento della parete dei capillari glomerulari (frecce) ed un'area di glomerulosclerosi nodulare (punta di freccia) in un glomerulo, in associazione a nefrite interstiziale (asterisco). MO 200x, coloraz. acido periodico di Schiff (Aresu *et al.*, 2007).

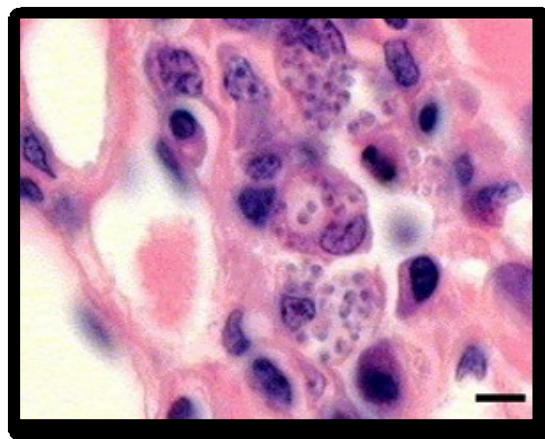


Figura 11 - Parenchima renale: macrofagi con amastigoti in sede interstiziale. EE, barra 5 μ m (Soares *et al.*, 2005).

FEGATO

La morfologia è alterata, con la presenza di infiltrati infiammatori (tra cui linfociti di origine plasmatica), la formazione di granulomi intralobulari²⁶ ed

²⁶ Una delle più importanti alterazioni istologiche della leishmaniosi viscerale umana.

intravascolari, ipertrofia ed iperplasia delle cellule del Kupfer. Gli epatociti vanno incontro ad alterazioni strutturali, con modificazioni anche del sistema endomembranario, contribuendo al deterioramento del metabolismo epatico (Alvar *et al.*, 2004). L'infiltrazione del parenchima epatico da parte di linfociti, istiociti e, soprattutto, plasmacellule, riflette l'attivazione policlonale delle cellule B che è caratteristica della leishmaniosi viscerale. I cani infetti, siano essi asintomatici, oligosintomatici o sintomatici, presentano gradi più o meno evidenti di infiammazione capsulare e portale (da cui dipende l'epatomegalia che è possibile apprezzare tra i segni clinici); tali processi, benché stimolati dal parassitismo, non sono in grado di risolvere l'infezione. I granulomi intralobulari risultano formati da cellule epiteliodi, scarsi linfociti e plasmacellule, rari granulociti e macrofagi che possono contenere amastigoti (come anche le cellule del Kupfer), e probabilmente si formano nel processo di reazione alla presenza del parassita, nel tentativo di contrastarne la moltiplicazione (la presenza di questi granulomi faciliterebbe l'eliminazione di *Leishmania* in seguito ad appropriata terapia). La semplice presenza del parassita a livello epatico è in grado di scatenare le reazioni immunomediate che portano alle suddette alterazioni, ma l'intensità della carica parassitaria non appare correlata alla gravità delle lesioni né alla loro persistenza, in quanto permangono anche in seguito alla soppressione del parassitismo a questo livello (Giunchetti *et al.*, 2008[2]).

MILZA

La polpa bianca va incontro a disorganizzazione, con solo pochi linfociti intorno all'arteriola centrale. La polpa rossa diventa ipercellulare, con plasmacellule e macrofagi parassitati nella zona marginale e con la proliferazione delle cellule endoteliali. La capsula e le trabecole si ispessiscono; i noduli linfatici mostrano ipertrofia delle regioni corticale e midollare; i centri germinativi appaiono formati da una zona iperplastica B-dipendente e molti macrofagi, mentre la zona T-dipendente è svuotata (Alvar *et al.*, 2004).

LINFONODI

Lima e coll. (2004) hanno dimostrato che il quadro più rilevante è rappresentato dall'ipertrofia/iperplasia di corticale e midollare, senza nessuna lesione specifica che distingua i soggetti asintomatici, oligosintomatici o sintomatici, suggerendo che la condizione immunopatologica linfonodale sia una caratteristica dell'infiammazione

cronica diffusa, non legata al quadro clinico della malattia. Successivamente Giunchetti e coll. (2008[1]) hanno condotto uno studio particolareggiato sui diversi aspetti dei *pattern* linfonodali (linfonodi poplitei) nei suddetti diversi gruppi di cani: nei soggetti affetti, il quadro prevalente è la deplezione delle strutture follicolari e dei linfociti dalla zona corticale, con la sostituzione da parte principalmente di macrofagi; invece a livello della midollare si ha una prevalenza del *pattern* iperplastico/ipertrofico a carico delle plasmacellule che predominano su linfociti e macrofagi²⁷. Inoltre, a livello della corticale, mentre nei cani asintomatici ed oligosintomatici prevale l'iperplasia/ipertrofia, nei soggetti sintomatici è più frequente l'atrofia, che viene messa in relazione con una diminuzione delle cellule nei centri germinativi della corticale (probabilmente per meccanismi immunomodulatori come l'apoptosi) (Alvar *et al.*, 2004).

MIDOLLO OSSEO

A livello midollare è possibile evidenziare diverse alterazioni, come la mielodisplasia²⁸, l'eccesso di fenomeni emperipoletici²⁹ ed eritrofagocitosici. La mielodisplasia interessa soprattutto la linea megacariocitaria, con la presenza di megacariociti più piccoli e più grandi della norma, mostrando anche anomalie nucleari (ipo- ed iper-lobulazioni e nuclei disorganizzati); queste alterazioni possono essere associate al rilievo clinico-laboratoristico di una trombocitopenia moderata, determinata sia da una ridotta produzione midollare, sia da un'aumentata distruzione splenica delle piastrine anomale. I soggetti sintomatici presentano un numero elevato di macrofagi a livello midollare, con la produzione di citochine da cui può dipendere la mielodisplasia. Meno frequentemente è interessata la linea eritroide, la cui displasia si esprime con la formazione di globuli rossi anormali quanto a maturazione e morfologia (frammentazione nucleare, cellule multinucleate, asincronie di sviluppo tra nucleo e citoplasma, mitosi atipiche) che, insieme ai fenomeni infiammatori

²⁷ Queste caratteristiche sono state dimostrate anche nella leishmaniosi viscerale umana e nel topo di laboratorio.

²⁸ La mielodisplasia consiste in un difetto qualitativo del midollo osseo: i precursori cellulari sono in numero normale od aumentato, ma le cellule che ne derivano vengono distrutte prima del passaggio nel torrente circolatorio (per es.: eritropoiesi inefficace, diseritropoiesi). In genere il fenomeno è accompagnato dall'aumento delle cellule immature e da alterazioni morfologiche (Tvedten e Weiss, 1999).

²⁹ L'emperipoiesi è il fenomeno per cui una cellula penetra nel citoplasma di un'altra; differisce dalla fagocitosi in quanto nell'emperipoiesi la cellula inglobata inizialmente non viene distrutta.

immunomediati, può avere un ruolo nella patogenesi dell'anemia in corso di leishmaniosi. L'emperipolesi, sotto forma, ad esempio, di neutrofili all'interno di megacariociti, può essere interpretata come una delle manifestazioni di anormalità midollare che caratterizza essenzialmente le forme clinicamente più gravi. Sono frequenti anche i fenomeni di eritrofagocitosi, con numerosi macrofagi che possono presentare nel loro citoplasma anche più cellule della linea eritroide, insieme ad eventuali amastigoti (Figura 12). Questa presenza simultanea può suggerire che l'eritrofagocitosi rappresenti una risposta abnorme alla produzione di citochine da parte dei linfociti T, molecole necessarie per la stimolazione della fagocitosi dei macrofagi (Foglia Manzillo *et al.*, 2006).

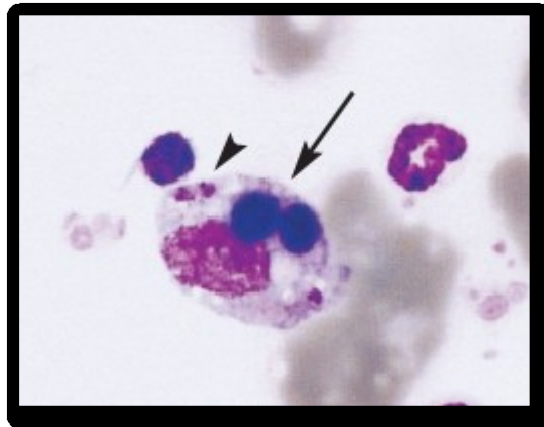


Figura 12 - Eritrofagocitosi nel midollo di un cane polisintomatico: una grossa cellula mononucleata ha inglobato 2 eritroblasti (freccia) e 3 amastigoti (punta di freccia) (Diff-Quick, 1000x) (Foglia Manzillo *et al.*, 2006).

Sono colpiti anche altri organi. Il parassita è in grado di coinvolgere varie mucose, con lesioni a livello di lingua e cavità orale in genere, e pene. Gli amastigoti e gli immunocomplessi inducono lesioni vascolari che coinvolgono le piccole arterie di numerosi organi (cute, tratto intestinale, reni, strutture oculari, polmoni, ecc.). Le lesioni oculari sono anche conseguenza dell'infiltrazione di plasmacellule e macrofagi (contenenti amastigoti) che danneggiano diverse strutture (Alvar *et al.*, 2004). I depositi di IgG interferiscono sulla permeabilità vascolare (García-Alonso *et al.*, 1996). Amastigoti ed IgG si rinvencono nelle cellule muscolari, in cui provocano necrosi ed atrofia (Vamvakidis *et al.*, 2000). Inoltre la meningite da *L. infantum* è stata descritta come caratterizzata da anticorpi contro il parassita presenti nel liquido cerebro-spinale (Viñuelas *et al.*, 2001). La continua stimolazione del sistema

immunitario può determinare la produzione policlonale di auto-anticorpi, come anticorpi anti-nucleari, contro le miofibre e gli eritrociti (Kramer *et al.*, 2006).

Un tale danno generalizzato a tessuti ed organi degli animali infetti è caratteristico, ed è paragonabile a quello dei soggetti umani infetti da HIV e *Leishmania*³⁰. In questi pazienti la deficienza delle difese immunitarie permette al parassita di diffondere in siti inconsueti, suggerendo che, nel caso del cane, una simile situazione sia il risultato di una grave immunodepressione indotta dal parassita. Tale deficienza immunitaria, all'inizio è specifica per il parassita, ma alla fine colpisce tutte le funzioni T-dipendenti dell'animale affetto (Alvar *et al.*, 2004).

³⁰ HIV e *Leishmania* hanno gli stessi bersagli cellulari (monociti/macrofagi) e quindi il loro effetto può essere sinergico; *in vitro* HIV promuove la replicazione di *Leishmania* ed indebolisce la capacità dei macrofagi di controllarne la crescita. Inoltre entrambi i patogeni inducono lo *shift* del profilo delle citochine da Th1 a Th2, con una ridotta produzione di IL-2 e IFN- γ , così come riducono il numero dei linfociti T CD4+ circolanti. Ciò nonostante, la terapia combinata con antiretrovirali, leishmanicidi ed IL-2 ricombinante (rIL-2), non sempre ha successo: è interessante una segnalazione in cui ad ogni ciclo di rIL-2, seguiva un aumento del DNA parassitario nel sangue, potendosi ipotizzare, in questa particolare circostanza, una qualche attività di potenziamento della citochina nei confronti di *Leishmania* (Bossolasco *et al.*, 2007).

2.3.1. Immunologia

L'immunologia della leishmaniosi canina è argomento di estrema difficoltà e di ostica comprensione, soprattutto perché gli studi specifici sul cane sono piuttosto recenti. Inoltre i dati pubblicati in letteratura sono spesso contraddittori, per cui al momento non è possibile stilare un quadro esaustivo su questo argomento, anche se c'è da tenere presente che le diverse ricerche si basano su presupposti (soggetti canini, specie di *Leishmania*, ecc.) spesso anche molto diversi³¹: cani di razze, età, condizioni cliniche differenti; infezioni naturali o sperimentali (in queste ultime manca quasi sempre una delle componenti fondamentali per lo stabilirsi dell'infezione, e cioè il flebotomo con tutto il suo bagaglio di molecole salivari [Barbiéri, 2006]); *L. infantum* (gli studi europei) o *L. chagasi* (gli studi brasiliani; pur essendo identiche, hanno pur sempre una storia filogenetica diversa) (Cardoso *et al.*, 2007), anche in considerazione che ci sono differenze di virulenza addirittura all'interno dello stesso zimodema MON-1 di *L. infantum* (Baptista-Fernandes *et al.*, 2007); metodologie operative (substrati, antigeni, *marker*, ecc.) diversi.

Nel cane non sono ancora noti con certezza i meccanismi coinvolti nel determinismo della sensibilità o della resistenza al parassita. Nell'infezione sperimentale del topo da *L. major*³² è conosciuta da tempo la dicotomia che si stabilisce nella risposta immunitaria contro il parassita, determinata dai linfociti T *helper* (Th) CD4+ e dalle citochine coinvolte. In questo modello i topi infetti sviluppano una forma di malattia auto-limitante oppure progressiva, in dipendenza del proprio *background* genetico. I soggetti delle linee sensibili (soprattutto topi BALB/c) non sono in grado di eliminare il parassita, a fronte della rapida espansione delle cellule Th2 con la produzione di IL-4 ed IL-10, mentre i soggetti resistenti (soprattutto topi C57BL/6 e CBA) possono controllare l'infezione, come risultato della prevalente espansione delle cellule Th1. Queste cellule producono IFN- γ ed altre linfocine che inducono la formazione di ossido nitrico (NO) sintetasi (iNOS) ed attivano la funzione microbica dei macrofagi parassitati (Alvar *et al.*, 2004); i macrofagi che esprimono

³¹ Nel modello sperimentale murino l'esito dell'infezione può variare in dipendenza dello stipite parassitario, del *background* genetico dell'ospite, del sito di inoculazione, dello stadio di sviluppo del parassita inoculato e della reattività del sistema immunitario dell'ospite (Tacchini-Cottier *et al.*, 2003).

³² Il modello sperimentale topo-leishmaniosi cutanea da *L. major*, è certamente quello più studiato e conosciuto nell'ambito di tutte le leishmaniosi.

maggiori quote di iNOS sono quelli in cui la carica parassitaria è minima, se comparata con quella dei macrofagi in cui l'iNOS è basso o assente (Zafra *et al.*, 2008). Nel caso della leishmaniosi viscerale umana (Karp *et al.*, 1993; Kenney *et al.*, 1998) e murina (Miralles *et al.*, 1994³³; Rolão *et al.*, 2007³⁴) non è possibile stabilire una chiara dicotomia nella risposta immunitaria, che invece risulta di tipo misto Th1/Th2. Anche nel cane non è mai stato possibile evidenziare una netta polarizzazione in questo senso, benché i diversi lavori pubblicati dagli anni Novanta ad oggi, siano tutt'altro che concordi. Resta il fatto che effettivamente ci sono cani in grado di resistere all'infezione ed altri che non lo sono affatto (Kramer *et al.*, 2006).

Nei cani infetti la resistenza è associata a bassi livelli di anticorpi specifici ed alla prevalenza dell'immunità cellulomediata, con la produzione di IL-2, TNF- α ed INF- γ (Pinelli *et al.*, 1994), citochine che sono in grado di stimolare l'attività leishmanicida dei macrofagi, nel quadro di una risposta di tipo Th1 (Vouldoukis *et al.*, 1996). La sensibilità è invece correlata con alti livelli anticorpali e con l'assenza di una risposta immunitaria cellulomediata, senza una risposta di tipo Th2 chiaramente rilevabile. Infatti alcuni studi sul profilo delle citochine che intervengono nella leishmaniosi canina, condotti utilizzando una PCR-transcriptasi inversa (RT-PCR), hanno dimostrato che i linfociti di cani infettati sperimentalmente, asintomatici e con immunità cellulomediata, esprimono citochine di tipo Th1, ma in seguito alla stimolazione con SLA (l'antigene solubile di *L. infantum*), esprimono una risposta mista Th1/Th2 (Alvar *et al.*, 2004). L'immunosoppressione che caratterizza i cani sintomatici, non risulta in relazione con uno specifico profilo riguardante le citochine (Pinelli *et al.*, 1999; Chamizo *et al.*, 2005), né con un'aumentata produzione di IL-10³⁵

³³ *L. donovani*.

³⁴ *L. infantum*: gli Autori hanno rilevato citochine sia Th1 che Th2 (IFN- γ , IL-4, IL-10) nella milza e nel fegato, e anche contemporaneamente IgG dei due isotipi IgG1 ed IgG2.

³⁵ L'interleuchina-10 (IL-10) è una citochina con ampie proprietà antinfiammatorie che derivano dalla sua capacità di inibire la funzione di macrofagi e cellule dendritiche (DCs), compresa la produzione di citochine proinfiammatorie (come l'IL-12). Benché l'IL-10 sia stata considerata una classica citochina Th2, viene in realtà prodotta anche dalle cellule Th1, che in questo modo controllerebbero se stesse (viste le proprietà anti-Th1 della citochina medesima) durante la risposta immunitaria alle infezioni. Ma in contrasto con le sue principali funzioni soppressive, l'IL-10 può anche rivestire un ruolo positivo in certe risposte immunitarie, come la stimolazione delle mast-cellule, l'*up-regulation* di alcuni geni dei fagociti, la promozione della differenziazione e migrazione dei LT citotossici (CTL) e l'attivazione dei linfociti B tramite l'*up-regulation* dell'espressione delle molecole dell'MHC di classe II e la stimolazione della risposta delle IgA. Dunque l'IL-10 riveste un ruolo di regolazione in senso soppressivo della risposta immunitaria cellulomediata, senza annullarla completamente ma comunque inducendo uno stato d'infezione persistente (O'Garra e Vieira, 2007).

(Strauss-Ayali *et al.*, 2007), la quale, nell'uomo, è stata associata con la sensibilità alla malattia (Kane e Mosser, 2001). Quinnell e coll. (2001[1]) hanno osservato che nei tessuti infetti dei cani malati non c'è aumento di IL-10 (ipotizzando che, al contrario di quanto avviene nell'uomo, questa citochina non rivesta un ruolo eminentemente immunosoppressivo) e solo in alcuni soggetti si ha un leggero incremento di IL-4. È probabile che la risposta di tipo Th2 si possa verificare durante il periodo d'incubazione della malattia, determinando la progressione dell'infezione che diviene clinicamente manifesta. In uno studio longitudinale eseguito da Santos-Gomes e coll. (2002) su cani infettati sperimentalmente, è stato osservato che, durante la maggior parte del periodo d'incubazione, non si verifica una risposta ben definita e che, appena prima dell'esordio dei sintomi, si ha una risposta di tipo Th1, la quale comunque non arresta lo sviluppo della malattia e scompare una volta che la sintomatologia diviene conclamata (Alvar *et al.*, 2004). Strauss-Ayali e coll. (2007) hanno dimostrato che nella milza (uno degli organi maggiormente parassitati) di cani infetti (sia naturalmente che sperimentalmente), viene espressa una risposta di tipo Th1, per gli elevati livelli di IFN- γ riscontrati a questo livello (nettamente superiori nei soggetti oligosintomatici rispetto ai polisintomatici - con una differenza inversa della carica parassitaria - sempre comunque superiori rispetto ai non infetti). Nel corso della malattia oligosintomatica tende invece a prevalere la risposta di tipo Th2, che si manifesta con l'aumento di IL-4 ed IL-5; e quindi, anche in questo caso, sarebbe dimostrata la sussistenza di una risposta mista Th1/Th2, non in grado di controllare il parassita localmente. Infatti anche nel caso dei soggetti oligosintomatici, nonostante gli elevati livelli di IFN- γ , nella milza non è possibile la completa eliminazione dei parassiti, probabilmente perché vi arrivano continuamente, in provenienza da altri tessuti altamente parassitati, in cui l'IFN- γ non è elevato. Inoltre, anche se l'IL-10 è praticamente assente, sono contemporaneamente presenti elevati livelli di IL-4, un'altra citochina soppressiva dell'immunità cellulare.

Nell'uomo è stata riportata una correlazione tra le classi e sottoclassi di immunoglobuline (Ig) ed il tipo di risposta contro l'infezione³⁶. Nel cane ci sono stati diversi tentativi di verificare questo assunto, in genere utilizzando solo pochi soggetti (Alvar *et al.*, 2004). In uno dei primi studi, Deplazes e coll. (1995) hanno messo in

³⁶ In alcuni individui si ha anche la comparsa di autoanticorpi IgG anti IgE, come espressione di una risposta Th2 modulatrice (Atta *et al.*, 2002).

relazione la comparsa di anticorpi specifici anti-*Leishmania* IgG2 con lo stato di soggetti asintomatici, mentre il prevalere delle IgG1 è stato associato con la progressione della malattia. Anche Nieto e coll. (1999) hanno osservato una correlazione tra la secrezione di IgG1 e lo sviluppo della leishmaniosi viscerale canina. Altri studi invece non sono stati in grado di dimostrarlo: Bourdoiseau e coll. (1997[2]) hanno riscontrato alti livelli di IgG2 sia in cani sintomatici che asintomatici; Leandro e coll. (2001) hanno confermato che non c'è correlazione tra livelli di IgG2 e resistenza all'infezione. Addirittura Cardoso e coll. (2007) hanno riscontrato livelli di IgG2 significativamente più alti nei soggetti sintomatici rispetto agli asintomatici. Solano-Gallego e coll. (2001[1]) in un ampio studio trasversale su 280 animali in diversi stadi dell'infezione, non hanno trovato alcuna relazione tra lo stato clinico e le sottoclassi di IgG secrete. Inoltre uno studio longitudinale di Quinnell e coll. (2003) ha dimostrato che le sottoclassi di IgG non rappresentano un buon *marker* per differenziare lo stato di resistenza o di sensibilità alla leishmaniosi canina. Anche Straus-Ayali e coll. (2007), nell'infezione sperimentale, pur rilevando un aumento delle IgG totali e delle singole sottoclassi separatamente, concludono che questi anticorpi non possono essere messi direttamente in relazione con la resistenza o la sensibilità alla malattia, anche perché non è possibile associare uno specifico profilo delle citochine con specifiche sottoclassi di IgG, neppure in seguito alla terapia³⁷. Oltre alle IgG è stato riportato che anche altre immunoglobuline - le IgE - possono subire un notevole incremento nei soggetti sintomatici, e questo aprirebbe la strada ad un loro utilizzo come *marker* di malattia attiva (Barbiéri, 2006).

L'inefficienza o l'assenza di una risposta immunitaria cellulomediata costituisce l'aspetto chiave nella patogenesi della malattia e della sua progressione. La depressione della funzione delle cellule T si manifesta, come nell'uomo, dall'assenza della risposta linfoproliferativa in vitro e con la risposta negativa al test cutaneo alla leishmanina (LST). Secondo Alvar e coll. (2004) la specifica immunosoppressione contro il parassita è dovuta, almeno in parte, alla carenza dei linfociti T CD4+: cani naturalmente infetti e con leishmaniosi attiva, hanno livelli di queste cellule nel sangue periferico significativamente più bassi rispetto a cani sani, mentre altri citotipi sono meno coinvolti. Gli Autori hanno osservato anche una correlazione diretta tra i livelli

³⁷ Allopurinolo 20 mg/Kg/die per OS.

dei linfociti T CD4+ e la risposta cellulare al parassita, dal momento che il recupero di questa risposta in seguito alla terapia, si verifica simultaneamente ad un incremento significativo della percentuale dei CD4+; e l'eventuale successivo declino immunitario dipende da una nuova caduta di dette cellule. Tale correlazione è stata messa in evidenza tramite saggi di deplezione cellulare, in cui la risposta linfoproliferativa all'antigene solubile di *Leishmania* (SLA) risulta ridotta in seguito all'eliminazione dei CD4+. Invece l'eliminazione di altri citotipi, come i linfociti T CD8+, non ha effetti in questo senso. La perdita dei linfociti T CD4+ è un processo che inizia presto in seguito all'infezione, e continua durante il periodo d'incubazione. Un importante aspetto correlato con la perdita dei CD4+ e dell'immunità cellulare, che conferma il ruolo decisivo di queste cellule nel controllo del parassita, è l'aumento della capacità infettante del cane nei confronti dei flebotomi, durante la progressione della malattia: la crescente incapacità da parte dell'ospite di controllare il parassita, determina una progressiva diffusione di *Leishmania* ad altri tessuti - cute in particolare - con l'aumento dell'infettività. Attraverso la xenodiagnosi Guarga e coll. (2000) hanno confermato che sussiste una debole correlazione tra i livelli delle cellule CD4+ e la percentuale di flebotomi che s'infettano in seguito a pasti di sangue sul cane. Anche secondo altri studi (Bourdoiseau *et al.*, 1997[1]; Moreno *et al.*, 1999; Guarga *et al.*, 2000, 2002) nei cani malati si assiste ad una riduzione della percentuale dei linfociti T CD4+ e del rapporto CD4+/CD8+, che si normalizzano in seguito alla terapia ed alla guarigione clinica.

I risultati dello studio di Reis e coll.³⁸ (2006[2]) confermano che i soggetti asintomatici hanno percentuali di CD4+ significativamente superiori ai sintomatici; ma, insieme ai cani oligosintomatici, mostrano anche valori di CD8+ superiori (anche rispetto ai non infetti). Inoltre tutti i cani infetti presentano una riduzione del rapporto CD4+/CD8+ rispetto ai non infetti, riduzione che risulta d'intensità variabile in funzione della gravità della forma clinica. Dall'analisi dei linfociti B (CD21+)

³⁸ *Leishmania chagasi*, Brasile. Oltre alle sottopopolazioni linfocitarie, lo studio ha riguardato anche il rapporto tra parassitismo nel midollo osseo, stato clinico ed i parametri emocromocitometrici: i cani sintomatici e con elevato parassitismo midollare (i due aspetti sono risultati correlati), mostrano dati ematologici più gravi rispetto ai soggetti asintomatici, oligosintomatici e con parassitismo midollare ridotto o assente (grave anemia con riduzione di Hgb, RBC e Hct, e leucopenia dovuta essenzialmente alla diminuzione di eosinofili e monociti; inoltre i soggetti con parassitismo midollare elevato mostrano anche una conta linfocitaria ridotta [linfopenia], rispetto ai cani con parassitismo midollare basso o moderato).

circolanti risulta che i cani sintomatici hanno valori assoluti significativamente più bassi rispetto ai non infetti ed agli asintomatici. Gli Autori hanno anche dimostrato che i linfociti circolanti dei soggetti asintomatici esprimono livelli superiori degli antigeni dell'MHC-II rispetto agli oligosintomatici, ai sintomatici ed ai non infetti; ed inoltre l'aumento dei CD8+ è in relazione con bassi valori di parassitismo midollare, proprio dei soggetti asintomatici e, in misura minore, degli oligosintomatici. Tali riscontri enfatizzano il ruolo protettivo dei linfociti T CD8+ in corso di leishmaniosi canina: queste cellule sono in grado di promuovere un'efficace risposta di tipo Th1, tramite la produzione di IFN- γ e l'induzione della lisi dei macrofagi infetti. In conclusione gli Autori affermano che la chiave di una risposta immunitaria efficace è rappresentata dall'incremento dei linfociti T circolanti (sia CD4+ che CD8+), insieme con l'aumento dell'espressione degli antigeni dell'MHC-II, responsabile di una migliore efficienza nel meccanismo di presentazione antigenica.

I risultati degli studi precedenti sono però in parziale o totale contraddizione con quelli di altre ricerche, come quella di Miranda e coll. (2007): analizzando le sottopopolazioni di linfociti T in diverse classi di cani infetti, anche in relazione alla risposta alla terapia³⁹, gli Autori non hanno rilevato differenze statisticamente significative nelle percentuali delle cellule CD4+ e del rapporto CD4+/CD8+, tra i cani malati (lievemente o gravemente), quelli infetti asintomatici e quelli non infetti (controlli). Parimenti anche Rosypal e coll. (2005[2]) non hanno rilevato variazioni significative delle percentuali dei linfociti CD4+ e CD8+ in cani sperimentalmente infetti con lo stipo Nord Americano di *L. infantum*. La comprensione dei motivi di tali discrepanze tra i diversi studi pubblicati, non è semplice ma, a parte le considerazioni fatte nell'*incipit* del presente paragrafo, deve essere osservato che le percentuali delle sottopopolazioni dei linfociti T possono variare anche notevolmente tra i singoli soggetti (Miranda *et al.*, 2007). Inoltre Miranda e coll. (2007) affermano che molti degli studi eseguiti in passato, sono stati condotti su un numero di casi esiguo e con *follow-up* brevi o assenti. Potrebbero anche essere in gioco altri citotipi linfocitari, sulla scorta di quanto è stato dimostrato nell'uomo: i soggetti sintomatici hanno livelli di linfociti T CD26 e CD30 superiori rispetto agli asintomatici (Ajadary *et al.*, 2006).

³⁹ Antimoniato di N-metil-glucamina + allopurinolo.

2.4. Sintomatologia

La leishmaniosi canina si manifesta quasi esclusivamente nella forma generalizzata (viscero-cutanea); le forme ad esclusiva localizzazione cutanea, come la leishmaniosi cutanea umana, sono molto rare ed anche in questi casi è possibile rinvenire i parassiti negli organi interni. Dunque la leishmaniosi canina è considerata una malattia viscerale in cui le lesioni cutanee sono una conseguenza della disseminazione del parassita (Slappendel *et al.*, 1998). Classicamente viene riportato che la malattia può presentarsi in forma acuta o cronica, ma questa distinzione nella pratica ha ben poca importanza in quanto è sempre piuttosto difficile individuare uno stadio clinico ben preciso, per il fatto che le manifestazioni ed i segni sono spesso sfumati e sfuggenti (Pizzirani, 1989). Ciò nonostante in genere gli animali affetti vanno incontro ad un processo di deperimento cronico con linfadenopatia generalizzata, anemia, lesioni cutanee di tipo desquamativo od ulcerativo, glomerulonefrite con proteinuria (Blavier *et al.*, 2001).

Nonostante la presenza stagionale dei flebotomi, la malattia non assume un carattere di stagionalità, probabilmente per l'estrema variabilità del periodo d'incubazione: Lanotte e coll. (1979) riportarono un intervallo da 20 giorni a 4 anni, anche se appaiono più realistici i tempi suggeriti da Gaeta e coll. (1994), da 2 a 8 mesi⁴⁰. Tale periodo minimo è stato confermato anche dalla sperimentazione di Santos-Gomes e coll. (2000) che, tra 5 cani inoculati per via intradermica con promastigoti di *L. infantum* in stadio stazionario altamente virulento, il primo soggetto minimamente sintomatico è stato un cane che, dopo 2 mesi, ha presentato megalia dei linfonodi poplitei (con concomitante rilevazione di amastigoti nella biopsia). Gli Autori hanno descritto anche la sequenza cronologica del destino dei parassiti in seguito all'inoculazione: 5 minuti dopo, l'osservazione microscopica degli strisci ottenuti da impronte biotiche cutanee, ha mostrato la presenza di promastigoti identici a quelli dell'*inoculum*; a 30 minuti: un insieme di grandi e piccoli promastigoti, promastigoti simil-metaciclici e tipici amastigoti extracellulari; a 1½ ore: promastigoti simil-metaciclici ed amastigoti extracellulari; a 3½ ore: numerosi

⁴⁰ Slappendel (1988) ha riportato i casi di cani che in Olanda, paese considerato indenne da leishmaniosi, hanno sviluppato sintomi da 5 a 7 anni dopo avere soggiornato in area endemica.

granulociti neutrofili ed alcuni macrofagi parassitati da amastigoti, amastigoti extracellulari, promastigoti, promastigoti simil-metaciclici e forme intermedie in divisione; 6½ ore dopo l'inoculazione, sono rimasti a livello cutaneo promastigoti simil-metaciclici, amastigoti extracellulari e promastigoti con corto flagello, mentre sono risultate assenti cellule parassitate. Inoltre tutti e 5 i cani hanno mostrato una risposta immunitaria umorale (DAT⁴¹ positivo) tra il primo ed il terzo mese dopo l'inoculazione.

Lo spettro di presentazione dei segni clinici è molto vario, a causa soprattutto delle differenze del parassita e delle varie risposte individuali, per cui si possono presentare forme cliniche estremamente diverse (Tabella 2): si va da una condizione anergica con disseminazione generalizzata ed un alto numero di parassiti, con pochi segni o nessun segno, a forme iperreattive in cui i parassiti non possono essere rilevati, ma i soggetti manifestano notevoli lesioni organiche ed una grave sintomatologia. Allo stesso modo, così come si possono avere diversi modi di presentazione, la sintomatologia può essere molto differente (Alvar *et al.*, 2004). La febbre, anche se non raramente viene segnalata, non viene quasi mai osservata a livello di visita clinica; quando è presente, interessa quasi esclusivamente giovani animali già debilitati da altri fattori, oppure sfugge all'osservazione perché interviene solo nelle primissime fasi dell'infezione. Nell'uomo invece l'ipertermia è un elemento pressoché costante, come la diarrea e la tosse (altri due sintomi molto rari nella leishmaniosi canina) (Ciaramella e De Luna, 1999). Ciaramella e coll. (1997), in uno studio clinico retrospettivo su 150 cani leishmaniotici, riportano solo 6 casi con ipertermia (insieme a linfadenomegalia generalizzata e senza lesioni cutanee), caratterizzata da una temperatura sopra i 40 °C, risolta nel corso della terapia anti-*Leishmania*.

Comunque sia, i confini tra le varie manifestazioni cliniche sono sfumati, tanto che possono realizzarsi forme croniche che si acutizzano improvvisamente (i relativi sintomi risultano generalmente legati a patologie immunitarie secondarie all'infezione primaria). Mentre Lanotte e coll. (1979) classificarono la leishmaniosi canina in acuta, subacuta, cronica e latente regressiva, Mancianti e coll. (1988) ed Abranches e coll. (1991) l'hanno classificata, in base alla presentazione dei sintomi clinici, in sintomatica, oligosintomatica ed infezione asintomatica. Le alterazioni esteriori che

⁴¹ Test di agglutinazione diretta.

con maggiore frequenza spingono il proprietario a ricorrere al veterinario, sono rappresentate da letargia, problemi cutanei, anoressia e perdita di peso (Ciaramella *et al.*, 1997).

Tabella 2 - Intervalli minimi e massimi delle frequenze di segni e sintomi clinici segnalati in letteratura (Slappendel, 1988 [80 casi]; Semião-Santos *et al.*, 1995 [93 casi]; Denerolle, 1996 [125 casi]; Ciaramella *et al.*, 1997 [150 casi]; Noli, 1999 [revisione]; Koutinas *et al.*, 1999 [158 casi]; Blavier *et al.*, 2001 [revisione]; Amusategui *et al.*, 2003 [61 casi]; Soares *et al.*, 2005 [34 casi]).

SEGNI E SINTOMI	FREQUENZA (%)
Lesioni cutanee ⁴²	35,3 - 100
Dermatite esfoliativa secca	27,9 - 90,9
Onicogrifosi	13,1 - 75
Ulcere ⁴³	21,3 - 64
Alopecia diffusa	14 - 27,9
Alopecia periorbitale ("segno degli occhiali", <i>lunettes</i>)	18
Noduli non ulcerati	4,5 - 17
Paronichia	13,6
Dermatite pustolosa sterile	1,6 - 13,6
Onicorressi	10,9
Iperpigmentazione Eritema	6,6
Depigmentazione nasale Ipercheratosi nasale/digitale	4,5
Linfoadenopatia generalizzata	65,2 - 96,1
Linfoadenopatia localizzata	4,9 - 90
Pallore delle mucose	58 - 94,2
Perdita di peso	21,3 - 70
Letargia, sonnolenza, debolezza	18 - 70
Anoressia	16,3 - 70
Febbre	4 - 70
Artropatie, osteite, zoppia, problemi di locomozione	3,2 - 64
Splenomegalia	9,5 - 53,3
Lesioni oculari	16 - 50
Congiuntivite	6,6 - 32,5

⁴² Localizzazione delle lesioni cutanee: padiglioni auricolari (19,7%), arti (16,4%), faccia e generalizzate (14,7%), altre localizzazioni (6,6%) (Amusategui *et al.*, 2003).

⁴³ Localizzazione delle ulcere: padiglioni auricolari (24%), naso (18%) (Ciaramella *et al.*, 1997).

SEGNI E SINTOMI	FREQUENZA (%)
Uveite	0,8 - 8,2
Cheratite	5,1 - 7,5
Cheratocongiuntivite secca	2
Panoftalmite	1,3
Cachessia ⁴⁴	1,5 - 47,5
Poliuria/Polidipsia	13 - 40
Epistassi	3,8 - 37
Diarrea	3,8 - 30
Vomito	3,3 - 26
Melena	3,3 - 12,5
Tosse, scolo nasale, polmonite, altri sintomi respiratori	1,1 - 6
Oliguria Prurito	4,9
Insufficienza renale senza altri segni	4
Iperviscosità ematica	2,4
Dolore addominale Otite Ematuria Porpora	1,6
Ittero	1,5
Stomatite ulcerativa	0,8

Con Alvar e coll. (2004), possiamo distinguere le varie forme cliniche, in senso cronologico (con valore più teorico che pratico), in: primi sintomi, periodo conclamato e periodo finale.

⁴⁴ Atrofia dei muscoli masticatori: 24,7% (Koutinas *et al.*, 1999).

2.4.1. Primi sintomi

Ci sono pochi studi che prendono in esame i sintomi all'esordio della malattia: solo l'infezione sperimentale ci fornisce qualche dato, anche se i diversi lavori pubblicati mostrano notevoli differenze, non solo per quanto riguarda i sintomi più precoci, ma anche nelle fasi successive di latenza e di progressione della malattia. Generalmente in questa fase non si manifesta una sintomatologia chiara e precisa: si può andare da alterazioni aspecifiche delle condizioni dell'animale, con esordio silente ed insidioso, ad uno sviluppo sempre più evidente e progressivo. Il dato più evidente è rappresentato da una lenta ma costante perdita di peso, accompagnata da astenia ed apatia. Dal terzo mese è possibile osservare i primi segni cutanei (aree alopeciche periorbitali ed auricolari), la congiuntivite ed è possibile che la palpazione della regione renale provochi dolore. Tra i primi segni che si verificano vengono anche riportate le emorragie (Alvar *et al.*, 2004).

2.4.2. Periodo conclamato

La leishmaniosi canina si può presentare con un'estrema variabilità di sintomi, quanto a numero ed intensità. Molti cani manifestano la classica sintomatologia, ma non sempre questa è apprezzabile. Ci sono comunemente diversi sintomi aspecifici come apatia, astenia, disoressia, polidipsia e dimagrimento. La linfoadenopatia è uno dei sintomi più caratteristici di questa fase, con l'aumento delle dimensioni e della consistenza dei linfonodi, per cui la palpazione di quelli superficiali diviene più agevole, in particolare dei linfonodi poplitei, prescapolari⁴⁵ e sottomandibolari. Si può apprezzare anche una certa epatomegalia, così come una discreta splenomegalia (Alvar *et al.*, 2004). Per quanto riguarda le lesioni cutanee, si può avere un'ampia gamma di segni: dalle aree alopeciche con desquamazione secca, scaglie amiantacee (aspetto molto tipico della malattia [Pizzirani 1989; Roze, 2005]) e seborrea, ad ampie aree ulcero-crostose (quelle che interessano i cuscinetti plantari sono spesso caratteristiche delle forme recidivanti della malattia [Pizzirani, 1989]). Queste lesioni in genere iniziano dal naso, dalle orbite e dai padiglioni auricolari, ed in seguito si

⁴⁵ Ciaramella e coll. (1997) riportano che i linfonodi prescapolari sono colpiti più spesso dei poplitei, probabilmente per le connessioni con i vasi linfatici craniali che drenano aree con le lesioni cutanee più gravi.

possono diffondere a tutto il corpo, specialmente nelle zone cutanee in corrispondenza di prominenze ossee (Alvar *et al.*, 2004). Nonostante le percentuali riportate in letteratura (Tabella 2), le lesioni cutanee della leishmaniosi non sono pruriginose (Pizzirani, 1989; Roze, 2005).

Spesso sono presenti segni oculari, come la congiuntivite mucopurulenta, con secrezione giallastra che aderisce al margine lacrimale. La mucosa è pallida a causa dell'anemia. Si può osservare cheratite, che può progredire in ulcerazione e conseguente cecità (Alvar *et al.*, 2004). L'eventuale blefarite in genere accompagna le lesioni corneali e/o degli annessi (Pizzirani, 1989). Può essere presente scolo nasale che progredisce da sieroso a mucopurulento. A volte c'è epistassi, monolaterale o bilaterale, sotto forma di gocciolamento intermittente/episodico o come vere e proprie emorragie difficili da controllare. L'atrofia muscolare è frequente ed è progressiva. Spesso è presente onicogrifosi o anche onicorressi. In rari casi si possono avere anche sintomi nervosi, con tremori, deficienze motorie e, negli ultimi stadi, paralisi degli arti posteriori. Ci può essere interessamento osteoarticolare (artriti, osteiti, artrosinoviti) con possibile zoppia (Alvar *et al.*, 2004). Il coinvolgimento renale è presente quasi sempre: si può avere da una proteinuria moderata (causata da diverse forme di glomerulonefrite) ad una compromissione organica completa (sindrome nefrosica, insufficienza renale cronica, uremia terminale) (Blavier *et al.*, 2001; Roze, 2005).

2.4.3. Periodo finale

Così come il periodo d'incubazione, anche la fase finale della malattia si può presentare con tempi e modalità molto diverse, per cui non è possibile alcuna previsione. La maggior parte degli organi vengono colpiti e, a livello cutaneo, l'estensione delle ulcere e delle alopecie, è praticamente generalizzata. Si possono instaurare processi infettivi opportunistici secondari. Si arriva alla cachessia e la morte è quasi sempre conseguenza dell'insufficienza renale od epatica (Alvar *et al.*, 2004).

2.4.4. Manifestazioni atipiche

2.4.4.1. Lesioni cutanee

FORMA NODULARE

Si possono avere da semplici papule a noduli simil-tumorali, in varie parti del corpo: dorso, addome, spazi interdigitali, lingua, giunzioni muco-cutanee (pene, labbra). Secondo alcuni Autori, il Boxer mostrerebbe una certa predisposizione. La diagnosi differenziale include: neoplasie (istiocitoma, mastocitoma, linfoma cutaneo), granulomi infettivi e sterili, granulomi eosinofilici, cisti cutanee, ascessi cutanei, elmintosi sottocutanea da *D. repens*, micetomi. La citologia e l'istologia in genere evidenziano numerosi amastigoti. Istologicamente i noduli corrispondono a granulomi, formati da un accumulo di macrofagi, cellule giganti multinucleate, pochi linfociti e plasmacellule. Solitamente queste lesioni non tendono a diffondere e quindi la prognosi è favorevole, in quanto, in assenza di segni sistemici, la positiva evoluzione della patologia può indicare una risposta cellulomediata adeguata. Più raramente si tratta di lesioni che rappresentano solo la prima fase di una classica forma generalizzata, dalla prognosi sfavorevole (Blavier *et al.*, 2001).

DERMATITE PUSTOLOSIA STERILE

Risulta ancora meno frequente della precedente. Istologicamente le lesioni sono improntate su una follicolite suppurativa e/o una dermatite pustolosa intraepidermica. La diagnosi diretta in genere evidenzia solo pochi amastigoti a livello del derma, ma non nelle pustole, la cui coltura microbiologica è sterile. La diagnosi differenziale include: piodermite superficiale, pemfigo foliaceo ed eritematoso, dermatosi pustolosa sottocorneale, pustolosi eosinofilica sterile (id).

DEPIGMENTAZIONE DELLE NARICI

La depigmentazione della parte esterna delle narici si realizza in genere senza ulcerazioni e può essere estesa anche alla mucosa nasale. La diagnosi differenziale include: lupus eritematoso, pemfigo eritematoso, micosi fungoide (id).

ULCERA DA INOCULAZIONE

Nelle aree endemiche può essere osservata raramente, come segno dell'inoculazione e dell'iniziale moltiplicazione del parassita. Queste ulcere il più delle volte sono localizzate nelle aree più glabre della testa - naso, parte esterna delle narici, parte interna dei padiglioni auricolari - che sono le zone maggiormente attaccate dai flebotomi. In genere compaiono 2-3 mesi dopo il periodo d'attività del vettore e possono persistere fino a 6 mesi, per poi scomparire spontaneamente.

Assomigliano alle lesioni che si osservano nella leishmaniosi cutanea umana da *L. infantum*. L'istologia rivela un infiltrato istiocitario ma non amastigoti. La sieroconversione, quando si verifica, compare sempre dopo la risoluzione delle lesioni, rendendo difficoltosa la diagnosi (id).

DERMATOFIBROSI NODULARE

Si tratta di una rara patologia, in genere una manifestazione paraneoplastica, associata a vari tumori primari, come il cistoadenocarcinoma o cistadenoma renale ed il leiomioma uterino. Nei pochi casi segnalati nella leishmaniosi canina, non è stato possibile evidenziare altre patologie primarie sottostanti. Comunque è opportuno inserire la leishmaniosi nella diagnosi differenziale della dermatofibrosi nodulare (id).

2.4.4.2. Segni muscoloscheletrici

SEGNI OSTEOARTICOLARI

Si tratta di manifestazioni infrequenti. La poliartrite di solito è il risultato di una reazione di ipersensibilità di tipo III, con il deposito di immunocomplessi all'interno delle articolazioni, anche se gli amastigoti possono essere identificati nel fluido sinoviale o nei macrofagi della membrana sinoviale. Di solito la poliartrite non è erosiva e può essere associata alla sinovite, che clinicamente viene apprezzata perché le articolazioni appaiono calde e gonfie, c'è dolore ed occasionalmente anche atrofia muscolare. Ci possono essere lesioni osteolitiche ed osteoproliferative a livello delle diafisi; la radiologia può mostrare un aumento della radiopacità intramidollare, che corrisponde alla sclerosi ossea; queste lesioni sono molto rare e possono essere attribuite ad un processo infiammatorio. In caso di lesioni osteoproliferative, la diagnosi differenziale deve includere: osteomielite batterica e micotica, metastasi neoplastiche e panosteite; in caso di lesioni litiche: artrite infettiva, poliartrite reumatoide, lupus eritematoso sistemico e malattie degenerative articolari. Si può osservare il distacco di un'unghia, accompagnato dal rigonfiamento della falange distale; questo può evocare un carcinoma squamocellulare; le radiografie del dito interessato suggeriscono un'artrite interfalangea od una periostite, ma senza lisi ossea, permettendo la differenziazione con la neoplasia (id).

SEGNI MUSCOLARI

Benché l'atrofia muscolare, più o meno diffusa, sia osservata piuttosto frequentemente, il sistema muscolare raramente può presentare lesioni isolate. Macroscopicamente i muscoli interessati appaiono con un'area rigonfia di consistenza soffice, di colore bianco-grigiastro, situata tra parti di muscolo normale. Istologicamente si apprezzano lesioni infiammatorie e degenerative associate ad un grande numero di istiociti parassitati (id).

2.4.4.3. Manifestazioni cardiovascolari

Lesioni del sistema cardiovascolare vengono segnalate occasionalmente con un'incidenza aneddotica: pericardite fibrinosa diffusa; granulomi nei ventricoli cardiaci; tromboembolismo associato a lesioni glomerulari e sindrome nefrosica (id). Denerolle (1996) riportò due casi in cui l'iperviscosità ematica, associata ad iperproteinemia, aveva provocato atassia ed edema di un arto posteriore in un soggetto ed un evidente edema facciale nell'altro.

2.4.4.4. Malattia renale isolata

L'insufficienza renale è uno dei classici sintomi generali che caratterizzano la leishmaniosi, ma raramente può essere l'unica manifestazione della malattia. Soprattutto in area endemica, la leishmaniosi andrebbe sempre considerata nel diagnostico differenziale in presenza di glomerulonefrite e sindrome nefrosica (Blavier *et al.*, 2001).

2.4.4.5. Manifestazioni digestive

Nella leishmaniosi è possibile l'insorgenza di lesioni isolate a livello del tratto gastroenterico (id). Denerolle (1996) riportò due casi di enterite emorragica acuta mortale. Sono segnalati anche alcuni casi di colite cronica con melena: biopsie endoscopiche rivelano la presenza di infiammazione granulomatosa ulcerativa e la presenza di molti parassiti. Per questo *Leishmania* può essere aggiunta alla lista degli agenti infettivi e parassitari che causano colite cronica: *Histoplasma*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Prototheca*, *Giardia*, *Trichuris*, *Ancylostoma*, *Uncinaria*, *Entamoeba*, *Balantidium*. È fondamentale la visualizzazione diretta degli amastigoti nei tessuti biotici di queste forme particolari, perché il tipo d'infiammazione non è specifico ed è paragonabile a quello di lesioni presenti in altre forme di colite, come la colite linfo-

plasmacellulare e la colite istiocitaria ulcerativa (Blavier *et al.*, 2001)⁴⁶. In un caso di leishmaniosi canina, la diarrea emorragica è stata associata ad una pancreatite rapidamente mortale, probabilmente dovuta all'arterite necrotizzante (immunomediata) responsabile anche di emorragie a livello gastrointestinale (Carrasco *et al.*, 1997⁴⁷). In merito a quest'ultimo aspetto, Pumarola e coll. (1991) hanno segnalato due casi di poliarterite necrotizzante sistemica, con lesioni in diversi organi (cute, tratto intestinale, reni, vescica, linfonodi mesenterici, surreni, miocardio, polmoni, occhi e plessi corioidei). Probabilmente alla base del processo infiammatorio-necrotico c'è la deposizione di immunocomplessi a livello delle pareti vascolari (anche se gli Autori non sono riusciti a metterli in evidenza). In casi come questo la diagnosi differenziale dovrebbe considerare: tossici (farmaci), forme immunomEDIATE (lupus eritematoso sistemico, artrite reumatoide), infezioni/infestazioni (Coronavirus, dirofilariosi) e disordini neoplastici.

2.4.4.6. *Disordini emostatici*

I fenomeni di sanguinamento (epistassi, ematuria, diarrea emorragica) che, con varie frequenze, vengono segnalati in letteratura, sono generalmente in relazione con lesioni infiammatorie od ulcerative proprie della malattia (Blavier *et al.*, 2001). Ci sono però anche rare segnalazioni di disordini emostatici: nell'infezione sperimentale è stato osservato che, se la malattia non viene trattata, si possono avere fenomeni di coagulazione intravasale disseminata (DIC), con conseguente trombocitopenia ed allungamento del tempo di trombina (TT) (Valladares *et al.*, 1998). Inoltre le lesioni epatiche croniche associate alla leishmaniosi, possono peggiorare la competenza emostatica dell'animale; in uno studio il tempo di tromboplastina parziale attivata

⁴⁶ Secondo Paltrinieri e coll. (2007), in generale, la presenza di amastigoti in organi che non presentano lesioni compatibili con la leishmaniosi, non può permettere di ascrivere al parassita, o comunque alla malattia, la lesione stessa. In realtà gran parte delle segnalazioni delle forme atipiche, corrono spesso questo rischio; un ragionamento più opportuno appare quello di Silva e coll. (2008) che, rinvenendo amastigoti negli organi genitali esterni di cagne infette, seppure con lesioni infiammatorie, concludono che non si tratta di un vero e proprio tropismo parassitario, in quanto simili lesioni sono proprie anche di soggetti non infetti, e quindi gli amastigoti vi possono essere veicolati all'interno di cellule macrofagiche.

⁴⁷ L'esame istologico rivelò la presenza di numerosi parassiti in sede linfonodale e splenica ma non pancreatica. Il cane era anche in insufficienza renale grave (creatininemia da 5,63 a 9,92 mg/dl; BUN inizialmente 107,1 mg/dl). L'amilasi e la lipasi sieriche erano molto aumentate; gli Autori ammettono che questo può avvenire anche nell'insufficienza renale (per il coinvolgimento dei reni nell'eliminazione di detti enzimi); a sua volta l'insufficienza renale può essere una complicazione della pancreatite (per l'aumento della resistenza vascolare renale dovuto al rilascio di sostanze vasocostrittrici e nefrotossiche).

(APTT) è risultato correlato in senso inverso con i livelli sierici della transaminasi ALT (Moreno, 1999). È probabile che il parassita determini un danno diretto dei recettori di membrana delle piastrine, a causa della formazione di aggregati parassitari sui trombociti stessi, attraverso un meccanismo di “immuno-aderenza”; le piastrine interessate dal fenomeno, non possono essere riconosciute come *self*, con la conseguente attivazione di fenomeni autoimmunitari ed il deterioramento dell’aggregazione piastrinica. Nelle forme di leishmaniosi clinicamente più gravi, la compromissione del sistema immunitario, l’infiammazione cronica persistente ed il progressivo deterioramento epato-renale, influenzano la funzione piastrinica, così come la sintesi ed il metabolismo dei fattori della coagulazione, determinando disordini emostatici sempre più gravi (Corona *et al.*, 2004).

2.4.4.7. Segni respiratori

Le segnalazioni sono molto rare e sostanzialmente episodiche, oltre che non molto ben documentate: rinite, polmonite e segni respiratori generici. È probabile che siano dovuti ad infezioni opportunistiche secondarie, conseguenti all’immunosoppressione della malattia (Blavier *et al.*, 2001).

2.4.5. Co-infezioni/infestioni

La presenza concomitante di *Leishmania* e di altri agenti infettivi o parassitari è piuttosto comune e può complicare la diagnosi: ehrlichiosi, hepatozoonosi, demodicosi, babesiosi. Nello studio clinico retrospettivo di Ciaramella e coll. (1997) viene riportato che, su 150 cani leishmaniotici esaminati, il 14% (21 soggetti) era anche sierologicamente infetto da *Ehrlichia canis*, il 10,6% (16 soggetti) aveva la rogna demodettica, il 6,7% (10 soggetti) quella sarcoptica, l’1,3% (2 soggetti) aveva l’hepatozoonosi; inoltre altri 2 soggetti presentavano un linfoma multicentrico⁴⁸. Per quanto riguarda la co-infezione leishmaniosi/neosporosi, in un’indagine sierologica svolta in Campania su 1.058 campioni, è risultato che il 6,4% erano positivi per gli anticorpi anti *Neospora caninum*, il 21% per quelli anti *L. infantum*, con una co-presenza nel 4,3% dei campioni, ed il 67,7% dei cani con *Neospora* erano positivi anche per *Leishmania*. Inoltre è risultato che le due infezioni si favoriscono a vicenda

⁴⁸ C’è anche una linea di pensiero che ipotizza un qualche legame leishmaniosi-neoplasie: l’infezione avrebbe un ruolo diretto nello sviluppo e nella progressione dei tumori (Ciaramella *et al.*, 1997).

(Cringoli *et al.*, 2002). Per quanto riguarda l'associazione leishmaniosi/demodicosi generalizzata, già nel 1989 Pizzirani raccomandava di inserire la prima tra le diagnosi differenziali per ogni caso di “rognna rossa” in un soggetto adulto, in considerazione del fatto che la demodicosi in forma conclamata necessita invariabilmente di una condizione predisponente⁴⁹. Mozos e coll. (1999) hanno compiuto uno studio dettagliato sulla co-infestione, analizzando clinicamente ed istopatologicamente le lesioni, compresa la componente immunologica coinvolta: la caratteristica più rilevante degli infiltrati infiammatori era il basso numero dei linfociti T CD3+, mentre abbondavano le plasmacellule (produttrici di IgG) ed i macrofagi.

⁴⁹ Deficit dei linfociti T *Demodex canis*-specifici, o soppressione della risposta immunitaria umorale o cellulare per malattie concomitanti, come endocrinopatie, infezioni cutanee (piodermite), corticoterapie o chemioterapie (Mozos *et al.*, 1999).

2.5. Terapia

Come è stato notato, l'infezione può evolvere, in tempi molto lunghi (settimane - mesi), in quadri estremamente vari e polimorfi che non sono sempre facilmente classificabili (Oliva *et al.*, 2007). Sarebbe auspicabile uniformare i protocolli terapeutici, anche per evitare fenomeni di farmacoresistenza (e conseguenti rischi per la salute pubblica) (Mancianti *et al.*, 2000); da qui scaturisce l'esigenza di tentare una classificazione che, lungi dall'intento di "ingabbiare" la patologia in schemi ottusamente ristretti, possa fornire a livello clinico uno schema d'intervento razionale, così come una possibile interpretazione prognostica (Oliva *et al.*, 2007). Anche perché, in alcuni casi, il ricorso alla terapia per soggetti che non ne avrebbero bisogno, può essere più dannoso della leishmaniosi in sé (Oliva *et al.*, 2004).

2.5.1. Classificazione (stadiazione)

SOGGETTI ESPOSTI

Si tratta di cani clinicamente sani nei quali la diagnosi cito-istologica, parassitologica e molecolare risulta negativa, ma con titoli anticorpali specifici non superiori a 4 volte il valore soglia del laboratorio di riferimento. In genere sono soggetti che soggiornano o hanno soggiornato, durante una o più stagioni di trasmissione, in una zona dove la presenza del flebotomo vettore è accertata. Questi soggetti in genere hanno livelli elevati di IFN- γ e IL-12 e sono positivi al test alla leishmanina (cani con immunità prevalentemente di tipo Th1), per cui potrebbero anche essere considerati "resistenti" alla malattia. Allo stato attuale non ci sono evidenze scientifiche che giustifichino la necessità della terapia in questi cani (Oliva *et al.*, 2004; 2007).

SOGGETTI INFETTI

Si tratta di pazienti asintomatici in cui è dimostrabile la presenza del parassita, tramite metodi di diagnosi specifica diretta (citologia/istologia/coltura) o anche del suo DNA (PCR) e con metodi specifici indiretti (sierologia). In zona endemica, la sola positività alla PCR, eseguita su biopsie cutanee di aree senza lesioni durante la stagione di trasmissione, può non essere sufficiente a definire infetto un cane (Oliva *et al.*, 2007). In genere questi soggetti esprimono una risposta immunitaria

prevalentemente Th2, con alti livelli di IL-4 e IL-10 e la negatività al test alla leishmanina. Solitamente si tratta di cani “preclinici” che andrebbero sottoposti alla terapia (Oliva *et al.*, 2004).

SOGGETTI MALATI

Si tratta di cani infetti che manifestano uno o più dei sintomi classici, o anche di quelli meno comuni, purché chiaramente correlabili all’infezione in atto. Soggetti malati sono anche quelli infetti che, pur non mostrando alcun segno clinico rilevabile, presentano alterazioni di laboratorio caratteristiche⁵⁰, o anche meno comuni purché sempre correlabili alla leishmaniosi. Questi cani sono quelli in cui il ricorso alla terapia è più ovvio (Oliva *et al.*, 2004; 2007).

SOGGETTI MALATI CON QUADRO CLINICO GRAVE

Questi cani infetti e malati hanno un quadro clinico grave se (id):

- Uno o più cicli terapeutici con farmaci anti-*Leishmania* non hanno sortito apprezzabili miglioramenti;
- È presente una nefropatia proteinurica;
- È presenta insufficienza renale cronica;
- Sono presenti gravi segni oculari che possano comportare la perdita funzionale e/o richiedano terapie immunosoppressive;
- Sono presenti gravi malattie osteoarticolari che possano invalidare la funzione motoria e/o richiedano terapie immunosoppressive;
- Sono presenti altre gravi patologie concomitanti (infezioni, parassitosi, neoplasie, disendocrinie o dismetabolismi).

2.5.2. Terapia specifica

⁵⁰ Anemia; neutrofilia e monocitosi con linfopenia ed eosinopenia; leucopenia; trombocitopenia; allungamento TT e/o APTT; iperproteinemia, ipoalbuminemia, rapporto Albumina/Globuline diminuito, aumento globuline α_2 , gammopatia mono/policonale; iperazotemia; aumento degli enzimi epatici; urine isostenuriche o scarsamente concentrate; proteinuria.

Purtroppo bisogna constatare che ancora oggi la leishmaniosi canina è una patologia praticamente inguaribile dal punto di vista strettamente parassitologico, benché, dal punto di vista clinico, la guarigione sia possibile, ed anzi frequente, allorché le condizioni iniziali del paziente non siano già compromesse (Mancianti e Bizzeti, 2000; Baneth e Shaw, 2002). Con un trattamento appropriato ed efficace il miglioramento clinico inizia ad essere evidente piuttosto presto, anche in pochi giorni: il peso aumenta, la megalia dei visceri e le lesioni cutanee si attenuano, il profilo ematologico migliora; quando questo tarda a verificarsi, può sorgere il sospetto di qualche patologia concomitante o di una farmacoresistenza. Comunque la risposta alla terapia si realizza con una marcata variabilità individuale: la maggior parte dei pazienti mostra un miglioramento clinico evidente, alcuni rispondono bene ma poi vanno in contro a recidive ed alcuni non rispondono affatto. Il sistema immunitario gioca un ruolo certamente fondamentale nel determinismo della risposta alla terapia (oltre che all'infezione in generale), ma questo aspetto non è ancora sufficientemente chiarito per comprendere una tale variabilità di risposte individuali (Miranda *et al.*, 2007). È importante il monitoraggio sintomatologico-laboratoristico (soprattutto della funzionalità renale, epatica e cardiaca) prima, durante e dopo la terapia; inoltre, in seguito alla fine del trattamento, sono necessari controlli periodici *ad vitam* per individuare eventuali recidive, piuttosto frequenti in seguito alla guarigione clinica (Alvar *et al.*, 2004). È anche vero che nelle zone endemiche non è possibile distinguere le reinfezioni dalle recidive vere e proprie (Mancianti e Bizzeti, 2000; Genchi e Pietrobelli, 2006), anche perché lo zimodema che viene praticamente sempre isolato in Italia è il MON-1 (*L. infantum*); in questo senso, recentemente è stato sviluppato un protocollo PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) che può differenziare la variabilità genetica che interessa lo zimodema, a partire da sangue periferico, e quindi può essere applicato per studi epidemiologici, soprattutto per l'identificazione di focolai autoctoni in ex-aree indenni (Nord Italia) (Ferroglia *et al.*, 2006). Affinché le probabilità di successo siano maggiori, è importante che, prima d'intraprendere la terapia, il proprietario venga educato approfonditamente sulle precauzioni igieniche, sulle corrette modalità di somministrazione dei presidi farmacologici, sulle possibilità di guarigione e sulla prognosi (Baneth e Shaw, 2002).

Tabella 3 - Rassegna bibliografica di alcuni farmaci utilizzati nella terapia specifica (da Cerundolo, 2001; Oliva *et al.*, 2004, modificati).

Farmaci	Vantaggi	Svantaggi	Protocolli
Antimoniato di n-metilglucamina [AnM]	<ul style="list-style-type: none"> - Miglioramento clinico rapido; - Sinergismo d'azione con altri farmaci (allopurinolo; ketoconazolo o metronidazolo); - Possibile utilizzo di formulazioni microincapsulate nei liposomi. 	<ul style="list-style-type: none"> - Durata trattamento prolungata⁵¹; - Effetti collaterali⁵²; - Trattamento costoso nel caso di cani di grossa taglia e per periodi prolungati; - Doppia somministrazione giornaliera per mantenere livelli ematici alti, data la rapida escrezione dall'organismo⁵³. 	<ul style="list-style-type: none"> - 50 mg/kg BID SC per 2 mm o per 30 gg per poi ripetere fino a normalizzazione del quadro clinico (Oliva <i>et al.</i>, 1998); - 100 mg/kg SID SC per 30 gg (+ allopurinolo 15 mg/kg BID OS [somministrato per altri 8 mm dopo sospensione AnM]) (Denerolle e Bourdoiseau, 1999); - 75-100 mg/kg BID SC per 2-3 mm (Pennisi, 2000).
Amminosidina	<ul style="list-style-type: none"> - Sinergismo d'azione nelle associazioni con antimoniali (ritarda il tempo d'eliminazione dell'AnM [Belloli <i>et al.</i>, 1995]). 	<ul style="list-style-type: none"> - Nefrotossicità ed ototossicità (reversibili); - Scarso successo. 	<ul style="list-style-type: none"> - 10 mg/kg SID SC per 30 gg (Poli <i>et al.</i>, 1997); - 10,5 mg/kg SID SC per 21 gg + AnM 50 mg/kg BID IM per 30 gg (Oliva <i>et al.</i>, 1998).
Amfotericina B desossicolato [AmB]	<ul style="list-style-type: none"> - Frequente negativizzazione della PCR su midollo osseo (Lamothe, 2001); - Possibile associazione con soluzioni di lipidi per ridurre la tossicità. 	<ul style="list-style-type: none"> - EV; - Nefrotossica (vasocostrizione renale e riduzione della filtrazione glomerulare); - Effetti collaterali: febbre, vomito, anoressia e periflebiti. 	<ul style="list-style-type: none"> - 0,5-0,8 mg/kg EV nell'arco di 15-45 secondi 2-3 volte la settimana fino ad una dose totale di 8-15 mg/kg (la terapia va interrotta se la creatinemia supera i 2,5 mg/dl) (Lamothe, 1997); - 1-2 mg/kg di una soluzione ottenuta mescolando 50 mg di AmB (diluata in 10 ml di acqua sterile) + 30 ml di acqua sterile e 10 ml di Intralipid® 10%. Somministrare 2 volte la settimana fino ad una dose cumulativa di 8-12 mg/kg (Lamothe, 2001).
Amfotericina B microincapsulata nei liposomi	<ul style="list-style-type: none"> - È da preferire rispetto alla forma libera perché i livelli plasmatici sono più elevati, l'emivita è ridotta e le concentrazioni spleniche ed epatiche sono più alte. 	<ul style="list-style-type: none"> - Molto costosa (AmBisome®); - Molto efficace ma non permette la sterilizzazione parassitologica (Oliva <i>et al.</i>, 2004). 	<ul style="list-style-type: none"> - 3 mg/kg SID EV per 5 giorni consecutivi + una singola dose dopo 10 gg dall'inizio del trattamento (Oliva <i>et al.</i>, 1995).

⁵¹ Periodi brevi o dosaggi insufficienti possono contribuire a creare ceppi di *Leishmania* resistenti ai composti antimoniali.

⁵² Dolorabilità al momento e nel sito dell'iniezione e reazioni tissutali locali; epatotossicità e nefrotossicità (possibile aumento transitorio di ALT ed aumento moderato dell'azotemia [Oliva *et al.*, 1998]), soprattutto se gli organi - reni in particolare - sono già "sofferenti" (Ikeda-Garcia *et al.*, 2007; Oliva, 2007); possibili disturbi gastrointestinali, dolore muscolare e rigidità articolare (Baneth e Shaw, 2002), pancreatite acuta e leucopenia (Moritz *et al.*, 1999).

⁵³ Alcuni Autori consigliano di suddividere la dose giornaliera in 3 somministrazioni (Chulay *et al.*, 1983 [leishmaniosi viscerale umana trattata con stibiogluconato di sodio, un altro antimoniale che contiene più alte concentrazioni di antimonio pentavalente {Sb^V}: 10 mg/kg q8hh; Thakur e coll. {1988} riportarono che con questo regime 3 pazienti su 4 morirono d'insufficienza cardiaca]; Ferroglio, 2007).

Farmaci	Vantaggi	Svantaggi	Protocolli
Pentamidina	L'associazione a particelle di polimetacrilato ne favorisce il trasporto agli organi bersaglio.	- Tassi ematici transitori; - Eliminazione lenta per accumulo epato-renale; - Istolesiva IM; - Effetti collaterali acuti e cronici.	4 mg/kg SID IM a gg alterni per 1 m (Oliva <i>et al.</i> , 1996).
Allopurinolo	- Sinergismo d'azione con l'AnM; - Anche in monoterapia come mantenimento una volta raggiunta la remissione clinica.	- Effetti collaterali: diarrea o anemia (uomo); - Scarsa efficacia in monoterapia.	- 20-30 mg/kg BID OS per 30 gg + AnM (75 mg/kg BID SC) e poi da solo per 12 mm (Ferrer <i>et al.</i> , 1995); - 20 mg/kg/die per 1 settimana al mese come mantenimento (Ginel <i>et al.</i> , 1998); - 15 mg/kg BID OS + AnM (100 mg/kg SID SC) e poi da solo per 8 mm (Denerolle, 1999).
Associazione metronidazolo + spiramicina	- Somministrazione orale in un'unica soluzione giornaliera; - Tossicità relativamente bassa di entrambi i principi attivi (alle dosi consigliate).	- Tossicità nervosa centrale ⁵⁴ del metronidazolo per dosaggi (67,3-129 mg/kg) sensibilmente superiori a quelli consigliati (Dow <i>et al.</i> , 1989).	Metronidazolo 25 mg/kg OS + spiramicina 150.000 UI/kg OS per 3 mm (Pennisi <i>et al.</i> , 2005).
Miltefosina	- Somministrazione orale in un'unica somministrazione giornaliera; - Risultati notevoli dei <i>trial</i> clinici sull'uomo ⁵⁵ , arrivati alla fase IV ⁵⁶ , con oltre il 90% di efficacia (Prasad <i>et al.</i> , 2004; Bhattacharya <i>et al.</i> , 2007); - Bianciardi (2007) ha riferito che ha efficacia comparabile a quella dell'AnM.	- Ancora nessuna pubblicazione <i>peer reviewed</i> specifica sul cane; - Effetti collaterali gastroenterici (vomito e diarrea); - Assolutamente controindicata in caso di gravidanza accertata, presunta o programmata ⁵⁷ .	2 mg/kg SID OS nel cibo per 28 gg + allopurinolo (Bianciardi, Oliva, 2007).

2.5.2.1. Tra farmaci vecchissimi, recenti e nuovissimi

ANTIMONIATO DI N-METILGLUCAMINA (ANM)

⁵⁴ Nell'uomo sono segnalati casi di tossicità da rari a rarissimi (da quella nervosa ai disturbi dell'udito [transitori: Iqbal *et al.*, 1999]).

⁵⁵ Condotti in India, in cui in certe regioni (per es.: Bihar) la farmacoresistenza dei ceppi locali di *L. donovani* nei confronti della classica terapia a base di AnM ha ormai raggiunto incidenze impressionanti.

⁵⁶ I *trial* di fase IV sono gli studi clinici eseguiti dopo la registrazione (e quindi l'entrata in commercio) del farmaco, condotti al di fuori del ricovero continuativo in strutture ospedaliere, e dunque solitamente meno controllabili, dal punto di vista della correttezza dei protocolli, ma più vicini all'uso pratico sul campo (Berman *et al.*, 2006).

⁵⁷ Nel topo, già 1-2 mg/kg (al di sotto o al limite del dosaggio clinico) risultano altamente embriotossici, fetotossici e teratogeni. Nel coniglio sono stati osservati effetti embriotossici e fetotossici in seguito a somministrazione orale di miltefosina durante l'organogenesi. Nella donna si raccomanda l'assunzione di contraccettivi orali durante la terapia e nei successivi 2-3 mesi (Sindermann e Engel, 2006).

L'AnM è il farmaco utilizzato da più tempo nella terapia della leishmaniosi canina (Alvar *et al.*, 2004). Il primo ad utilizzare l'antimonio (Sb) per trattare la leishmaniosi viscerale umana fu Vianna nei primi anni del Novecento, tramite il tartrato antimoniale di potassio (tartaro emetico); successivamente, nel 1915, anche Christina e Caronia in Italia e Rogers in India, utilizzarono gli antimoniali per la cura della malattia. L'antimonio presente in queste formulazioni pionieristiche era però trivalente (Sb^{III}), piuttosto irritante e tossico in generale, tant'è che Cole affermò che l'utilizzo terapeutico del tartaro emetico non era molto meglio di nessun trattamento. Gli effetti collaterali maggiormente rilevati erano la tosse, il dolore toracico ed una grave depressione. Per questo negli anni Venti si arrivò alla scoperta degli antimoniali pentavalenti (Sb^{V})⁵⁸ e dal 1945 iniziò la commercializzazione dell'AnM come lo conosciamo oggi. Nonostante il suo impiego da così tanto tempo, ancora non è chiara la sua chimica, né tanto meno il meccanismo d'azione. L'AnM viene preparato dalla reazione di Sb^{V} con l'n-metil-d-glucamina che, dal punto di vista strutturale, pare formino una catena in cui si alternano: ciascuna metà dell'n-metil-d-glucamina è legata ad una molecola di Sb^{V} . Dal punto di vista farmacocinetico, Sb, dopo somministrazione parenterale, si distribuisce in alte concentrazioni nel plasma, nel fegato (in cui si trasforma in Sb^{III}) e nella milza (Mishra *et al.*, 2007). Nonostante sia stata a lungo consigliata la somministrazione endovenosa o intramuscolare, è stato verificato che la via che consente la maggiore persistenza di Sb nel sangue (prolungamento dell'emivita), è quella sottocutanea (più dell'80% di Sb viene escreto nell'urina entro le prime 9 ore dalla somministrazione); inoltre è anche la via che consente di minimizzare gli effetti collaterali dovuti alla somministrazione stessa, come l'istolesività muscolare (Mancianti e Bizzeti, 2000). Per quanto riguarda il meccanismo d'azione, la tossicità dipende dalla riduzione *in vivo* di Sb^{V} in Sb^{III} a cui sono sensibili sia i promastigoti che gli amastigoti (mentre i promastigoti non lo sono alla forma pentavalente). Il sito e la modalità di riduzione sono controversi: *in vitro* Sb^{V} può essere ridotto spontaneamente nella forma trivalente dalla glutatione-S-transferasi, allorché i tioli di basso peso molecolare, come il GSH ed uno specifico tripanotone parassitario, fungono da riduttori; tale riduzione si verifica più rapidamente in un ambiente acido, com'è quello all'interno dei vacuoli parassitofori. Studi biochimici compiuti negli ultimi 20 anni, hanno indicato un certo numero di

⁵⁸ Stibamina di urea, stibosan e neostibosan.

potenziali bersagli dell'azione leishmanicida degli antimoniali. Tra questi c'è la glicolisi, in particolare l'inibizione della fosforilazione dell'ADP e della β -ossidazione degli acidi grassi; dal momento che l'ADP viene fosforilato ad ATP con l'utilizzo del NADH generato dalla glicolisi e dal ciclo dell'acido citrico, i livelli di ATP intracellulare, necessari per la sopravvivenza di *Leishmania*, decadono. Inoltre Sb^V si lega al ribosio, formando complessi stabili con i nucleosidi dell'adenina, che agiscono da inibitori dei trasportatori della purina del parassita; la formazione di questi complessi interferisce con il metabolismo nucleosidico ed agisce in sinergia con alcuni derivati nucleosidici citotossici. È stato anche messo in evidenza un effetto inibitorio degli antimoniali sulle topoisomerasi del DNA: l'enzima di tipo I è altamente sensibile al farmaco e quindi si ha l'inibizione della topoisomerizzazione catalizzata dall'enzima stesso (Mishra *et al.*, 2007).

Due problemi tutt'altro che irrilevanti con l'utilizzo dell'AnM sono gli effetti collaterali (Tabella 3) e la possibile farmacoresistenza, verificata più volte nel corso degli ultimi 30-40 anni (Mancianti e Bizzeti, 2000; Mishra *et al.*, 2007). Gli effetti collaterali possono essere immediati (stibiointolleranza), con vomito, mialgie, eruzioni cutanee e disturbi della termoregolazione, oppure possono presentarsi successivamente (stibiotossicità), con anoressia, insufficienza renale⁵⁹ ed alterazioni cardiovascolari⁶⁰ (Mancianti e Bizzeti, 2000). Per quanto riguarda la funzionalità renale, c'è da dire che in teoria, visto che le lesioni organiche sono quasi sempre dovute a fenomeni immunopatologici coinvolgenti soprattutto gli immunocomplessi, l'utilizzo dell'AnM, essendo uno dei farmaci più attivi in senso leishmanicida, riducendo l'antigene, dovrebbe consentire un miglioramento di alcuni dei segni legati alla disfunzione renale (per es.: la proteinuria). In realtà nella pratica questo può anche non accadere: anche se in genere, con una preesistente moderata compromissione della funzionalità renale (per es.: con proteinuria modesta e senza iperazotemia), non si osservano alterazioni evidenti dei parametri renali o dei relativi segni clinici, quando la situazione è più compromessa, l'AnM può peggiorare il quadro renale fino a portare a morte od a

⁵⁹ In medicina umana ci sono alcune segnalazioni di casi anche gravi d'insufficienza renale, in seguito all'utilizzo degli antimoniali in pazienti che, prima della terapia, presentavano una funzionalità renale nella norma (Veiga e Sampaio, 1983 [ipotesi: "disfunzione" tubulare]; Hantson *et al.*, 2000 [durante la terapia con antimoniali, l'emocromo, la funzionalità renale ed epatica e l'analisi delle urine vanno eseguiti periodicamente, a prescindere dai disturbi evidenti]).

⁶⁰ Spesso si osservano effetti cardiotossici: alterazioni del ritmo, modificazioni dei tempi, voltaggio e morfologia delle onde e segmenti dell'ECG.

richiedere l'eutanasia (Ikeda-Garcia *et al.*, 2007). Per questi motivi, prima d'intraprendere la terapia con AnM, deve essere valutata attentamente (stadiazione) l'eventuale insufficienza renale preesistente, al fine di individuare l'entità del rischio di tossicità (Baneth e Shaw, 2002). Inoltre, in corso di terapia, è di fondamentale importanza il monitoraggio costante della proteinuria e dell'azotemia (BUN e creatininemia): qualora si dovessero riscontrare degli aumenti, è necessario interrompere la terapia o, almeno, ridurne le dosi (Zini *et al.*, 2007).

Valladares e coll. (2001) hanno riportato l'esperienza dell'utilizzo di un protocollo consistente nell'iniezione EV di AnM, seguita dopo 10 giorni da quella di una formulazione di AnM incapsulato in liposomi, una volta al giorno per due giorni per via EV e poi per 8 giorni per via SC⁶¹: le concentrazioni plasmatiche di Sb sono risultate superiori a quelle della forma libera (emivita allungata), inoltre Sb raggiunge concentrazioni terapeutiche nei tessuti infetti. Nei soggetti trattati si è avuta la guarigione clinica, l'assenza di ricadute e di alterazioni delle globuline γ in un anno di *follow-up*. La bontà dell'assunto si basa sul fatto che i liposomi vengono fagocitati dai macrofagi di fegato, milza e midollo osseo, sedi elettive di *Leishmania*; sperimentalmente la formulazione si è rivelata circa 200 volte più attiva del semplice AnM, consentendo dosaggi molto più bassi (Alving, 1986; Frézard *et al.*, 2000). Successivamente Schettini e coll. (2005) hanno confermato le concentrazioni superiori di AnM a livello midollare, benché il protocollo delle somministrazioni multiple della formulazione liposomiale non sia riuscito ad eliminare completamente i parassiti.

ALLOPURINOLO

Dal punto di vista chimico l'allopurinolo è la 4-idrossipirazolo[3,4-d]pirimidina. È stato il primo farmaco ad essere introdotto per la terapia orale della leishmaniosi, alla fine degli anni Settanta. Viene assorbito bene nel tratto gastroenterico e circa il 20% della dose somministrata viene eliminata con le feci. L'emivita plasmatica è di circa 1-2 ore per l'alta velocità di filtrazione glomerulare (escrezione renale). L'allopurinolo ed il suo principale metabolita - l'ossipurinolo - inibiscono l'enzima adenilsuccinato sintetasi, che catalizza la conversione dell'acido inosinico in adenosin monofosfato. L'allopurinolo viene idrolizzato in ribosidi, analoghi dell'inosina e, in

⁶¹ Infezione canina sperimentale.

questa forma, viene incorporato nell'RNA del parassita al posto dell'ATP, interferendo con la normale sintesi proteica parassitaria. Comunque sia, l'adenilsuccinato sintetasi o l'adenin fosforibosiltransferasi sono i probabili bersagli del farmaco (Mishra *et al.*, 2007).

Vengono riportati successi terapeutici molto contraddittori, sia nell'uomo che nel cane, benché in quest'ultima specie non siano disponibili *trial* clinici veri e propri. Esprimendo proprietà leishmaniostatiche, in teoria il suo utilizzo con altri farmaci (leishmanicidi) dovrebbe esprimersi in senso sinergico. Non sembra che l'allopurinolo migliori la risposta iniziale al trattamento, piuttosto ritarda e riduce la frequenza delle recidive (Alvar *et al.*, 2004; Noli e Auxilia, 2005). Ginel e coll. (1998) hanno comparato l'efficacia di due protocolli nella prevenzione delle recidive in seguito alla guarigione clinica dopo un primo trattamento (AnM 100 mg/kg/die + allopurinolo 30 mg/kg/die): il gruppo di cani che ha ricevuto la terapia di mantenimento con allopurinolo (20 mg/kg/die per una settimana al mese) non è andato incontro a ricaduta in un periodo di 10-44 mesi, mentre l'86% dei cani del gruppo non trattato col mantenimento è andato incontro a ricaduta entro 14 mesi; inoltre nei cani sottoposti al trattamento "intermittente" gli anticorpi specifici sono diminuiti o non sono cambiati affatto e non è stato evidenziato alcun effetto collaterale direttamente attribuibile al farmaco. Lo studio di Saridomichelakis e coll. (2005[1]) dimostra che un analogo trattamento (allopurinolo 20 mg/kg SID una settimana al mese da aprile a novembre) non è in grado di prevenire l'infezione né di eradicare il parassita eventualmente già presente⁶², per cui risulta inutile un eventuale impiego in senso profilattico in soggetti sani. È risultato anche che associando l'allopurinolo con l'AnM o con l'amfotericina B, si ha una riduzione significativa, ma non completa, dell'infettività dei cani trattati nei confronti dei flebotomi (xenodiagnosi), rispetto alla somministrazione dei 3 principi separatamente (l'allopurinolo da solo è il meno efficace) (Alvar *et al.*, 2004).

Nel cane l'allopurinolo non ha mai manifestato effetti collaterali rilevanti, anche se sussiste un rischio relativo che induca iperxantinuria (Mancianti e Bizzeti, 2000) con possibile formazione di uroliti di xantina, eventualità meno rara se è concomitante una patologia epatica (Noli e Auxilia, 2005). Viene riportato che la sua

⁶² Anche se il protocollo è identico a quello di Ginel e coll. (1998), gli intenti e l'oggetto di studio sono chiaramente diversi.

somministrazione non migliora una malattia renale preesistente, anche se nell'uomo si segnala che può indurre nefrite interstiziale; sulla base di questa estrapolazione, Koutinas e coll. (2001) preconizzano nel cane una riduzione del dosaggio in caso di insufficienza renale preesistente. In soggetti con proteinuria asintomatica, il trattamento con allopurinolo per 6 mesi (10 mg/kg OS BID), ha consentito una sua significativa riduzione e, nel 30% dei casi, una sua completa scomparsa; inoltre in 11 soggetti su 12, il trattamento avrebbe prevenuto la comparsa della proteinuria stessa (Plevraki *et al.*, 2006).

METRONIDAZOLO, SUE ASSOCIAZIONI E FLUORCHINOLONI

Il metronidazolo chimicamente è l'1-(α -idrossietil)-2-metil-5-nitroimidazolo, sotto forma di polvere cristallina scarsamente solubile in acqua e dunque somministrabile quasi esclusivamente per via orale (McDougald e Roberson, 1991), anche perché per l'assorbimento necessita (come per tutti gli azoli) di un ambiente acido (pH < 3). Il metabolismo avviene nel fegato e viene escreto con la bile e l'urina in forma inattiva. Viene ampiamente distribuito nell'organismo per la sua natura lipofila. Il meccanismo d'azione degli azoli nei confronti di *Leishmania*, pare che verta sull'inibizione del metabolismo degli steroli, che il parassita deve sintetizzare *de novo*, tramite il blocco della demetilazione, con mancata formazione dei precursori sterolici (5-deidroepisterolo ed ergosterolo) (Mishra *et al.*, 2007).

L'interesse per il metronidazolo è sorto dalla considerazione di alcuni studi *in vitro* ed *in vivo* nell'uomo, anche coinfecto da HIV, in cui il metronidazolo è stato usato con diversi dosaggi e formulazioni, con risultati abbastanza incoraggianti, anche se non sempre (Tabella 4).

Tabella 4 - Prove di efficacia del metronidazolo ed utilizzo clinico nell'uomo.

Target	Efficacia	Bibliografia
Paziente con leishmaniosi cutanea	Efficace	Long, 1973
Promastigoti di <i>L. donovani</i>	Arresta la crescita anche a basse concentrazioni	Al-Khateeb <i>et al.</i> , 1977
Topi infetti da <i>L. tropica</i>	Nessun effetto sullo sviluppo delle lesioni cutanee (50 mg/kg/die OS per 14 gg)	Bjorvatn e Neva, 1979

Target	Efficacia	Bibliografia
Paziente con leishmaniosi viscerale	Efficace (800 mg OS TID per 5 gg) associato al cotrimoxazolo (lungo periodo)	Murphy e Bong, 1981
Paziente con leishmaniosi viscerale (scarso successo di precedente terapia con AnM)	Efficace (1 gr OS per 10 gg)	Masramon <i>et al.</i> , 1981
Criceto infetto da <i>L. mexicana</i> e <i>L. donovani</i>	Nessuna attività (4 dosi orali per totali 375 mg/kg)	Keithly e Langreth, 1983
Topi BALB/c infetti da <i>L. major</i>	Scarsa o nessuna attività di un unguento sulle lesioni cutanee	El-On <i>et al.</i> , 1984
Promastigoti in provetta	Arresto del movimento (5-9 mg per provetta)	Yago, 1991
Macrofagi di essudato peritoneale di topi BALB/c infetti da <i>L. donovani</i>	Uccisione dei parassiti intracellulari (10 µg/ml)	Arora <i>et al.</i> , 1991
Leishmaniosi viscerale umana	Efficace	Laguna del Estal <i>et al.</i> , 1994
Paziente con AIDS	Efficace	Arranz-Caso <i>et al.</i> , 1995
Topi BALB/c infetti da <i>L. infantum</i>	Efficacia da solo < associato con l'AnM (70-140 mg/kg OS per 20 gg)	Gangneux <i>et al.</i> , 1999[1]
Paziente con leishmaniosi cutanea (18 lesioni)	Efficace (scomparsa lesioni con residua cicatrice; 1.500 mg OS SID per 21 gg)	Kassa-Kelembho <i>et al.</i> , 2003

Pennisi e coll. (2005; Tabella 3) riportano un'efficacia piuttosto soddisfacente dell'associazione metronidazolo e spiramicina (l'attività di quest'ultima non è mai stata messa in relazione ad una qualsivoglia proprietà leishmanicida) nella terapia della leishmaniosi canina, proponendola almeno come seconda scelta nei casi in cui l'utilizzo dell'AnM non sia percorribile. Gli effetti collaterali sono scarsi: nel corso della terapia dello studio in alcuni cani c'è stato un aumento dei livelli sierici di amilasi ed ALT e, in un caso, anche di BUN (analoghe alterazioni sono state osservate anche nel gruppo-controllo trattato con l'associazione classica AnM + allopurinolo secondo il protocollo di Denerolle e Bourdoiseau [1999; Tabella 3]); l'alterazione più frequente è l'aumento dell'amilasi anche se senza segni clinici riferibili a pancreatite.

Bianciardi e coll. (2004) hanno condotto uno studio volto a stabilire l'efficacia dell'enrofloxacin *in vitro* ed *in vivo* in cani leishmaniotici, in monoterapia ed associato al metronidazolo: l'enrofloxacin non ha mostrato alcuna proprietà leishmanicida diretta nei confronti degli amastigoti (a causa di una mancata attività verso le DNA topoisomerasi parassitarie e/o della scarsa distribuzione all'interno dei fagolisosomi

macrofagici); invece è stato in grado di stimolare il *killing* macrofagico (con aumentati livelli di O_2^-), probabilmente attraverso meccanismi di rilascio di citochine da linfociti precedentemente stimolati dal contatto con il chemioterapico. Dal punto di vista clinico, con l'utilizzo dell'enrofloxacin e, ancora di più, quando associato al metronidazolo, alcuni cani hanno mostrato un miglioramento sintomatologico e di alcuni parametri di laboratorio (PCV, piastrine, proteine totali e rapporto albumina/globuline). 6 dei 12 cani trattati con il solo enrofloxacin (20 mg/kg SID per 30 gg) sono andati incontro a recidiva tra 60 e 90 giorni dalla fine della terapia. I risultati non sono sufficienti a giustificare un utilizzo dell'enrofloxacin, da solo o in associazione al metronidazolo, in sostituzione della terapia classica AnM + allopurinolo; l'utilizzo del chemioterapico può avere senso nei casi, non infrequenti, di infezioni secondarie cutanee, visto l'ampio spettro d'azione verso una grande varietà di microrganismi. In un altro studio preliminare (6 soggetti), il metronidazolo (25 mg/kg) è stato associato all'ibafloxacin (fluorchinolone sintetico, 20 mg/kg) per 30 giorni, fornendo risultati piuttosto incoraggianti, dal punto di vista del miglioramento clinico e dei parametri di laboratorio, suggerendo l'associazione come strada percorribile nei casi d'insufficienza renale, "sofferenza" epatica, effetti collaterali o mancata efficacia dell'AnM (Bizzeti *et al.*, 2006). Recentemente, sulla base di alcune evidenze sperimentali (Vouldoukis *et al.*, 2006) e dei dati incoraggianti di uno studio preliminare su cani leishmaniotici, il marbofloxacin (un altro fluorchinolone) è stato proposto come valida alternativa alla terapia classica (2 mg/kg OS SID per 28 giorni) (Rougier *et al.*, 2008). Stefani (2005) ha riportato buoni risultati con il marbofloxacin (5 mg/kg OS SID) associato al metronidazolo (15 mg/kg OS BID) ed all'allopurinolo (30 mg/kg/die OS) in cani con insufficienza renale (BUN > 100 mg/dl, creatininemia > 2.5 mg/dl, rapporto PU/CU > 1); successivamente, avendo notato una scarsa utilità del metronidazolo, l'ha tolto dal protocollo ed ha dimezzato il dosaggio del fluorchinolone (Stefani, 2007, comunicazione personale).

MILTEFOSINA (ESADECILFOSFOCOLINA)

Gli alchilfosfolipidi hanno destato interesse dapprima come agenti anti-tumorali⁶³ ed in seguito come leishmanicidi. La miltefosina e l'edelfosina hanno mostrato un'attività promettente contro *L. donovani* in colture tissutali ed in modelli murini (Mishra *et al.*, 2007). La farmacocinetica della miltefosina nel cane è indipendente dalla razza e dal sesso; dopo somministrazione orale viene assorbita lentamente, ma quasi completamente, nel tratto gastroenterico, con una biodisponibilità assoluta del 94%, raggiungendo le massime concentrazioni ematiche (che sono proporzionali alla dose) tra 4 e 48 ore dopo la somministrazione. La *clearance* plasmatica è molto lenta e l'emivita d'eliminazione terminale è di 159 ore. In conformità con la lentezza dell'assorbimento e dell'eliminazione, i tassi d'accumulo, calcolati in base alla concentrazione massima nel sangue dopo somministrazione singola e ripetuta, hanno valori tra 5 e 6. La miltefosina si distribuisce ampiamente nell'organismo, con le massime concentrazioni riscontrate, in senso decrescente, in reni, mucosa intestinale, fegato e milza. Non è stato indagato direttamente il passaggio placentare, ma si presume che avvenga, così come l'escrezione nel latte (Sindermann e Engel, 2006). Molti studi hanno dimostrato che la miltefosina è citotossica sia nei confronti dei promastigoti che degli amastigoti di *Leishmania*, così come contro altri protozoi, come *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei*, *Entamoeba histolytica* ed *Acanthamoeba* spp (Mishra *et al.*, 2007). Inoltre determinerebbe una stimolazione dell'attivazione dei linfociti T e dei macrofagi (Baneth e Shaw, 2002). Ci sono diverse ipotesi proposte sul meccanismo d'azione: danno della membrana flagellare, perturbazione del metabolismo degli alchilfosfolipidi e della biosintesi del glicosilfosfatidilinositolo, interferenza con il rimodellamento etere-lipidico attraverso l'inibizione della specifica aciltransferasi dell'alchil-liso-fosfatidilcolina, inibizione della sintesi *de novo* della fosfatidilcolina. Viene anche riportato che la miltefosina induce una sorta di apoptosi di *Leishmania*, simile all'analogo processo che avviene nei metazoi (Mishra *et al.*, 2007).

In pazienti umani oncologici la miltefosina ha indotto l'aumento dei leucociti e delle piastrine; così come soggetti leishmaniotici hanno trovato giovamento in

⁶³ A causa degli effetti collaterali della miltefosina OS in pazienti oncologici, è stato autorizzato l'utilizzo della sola formulazione topica (Miltex®, Baxter™), per la cura delle metastasi cutanee del carcinoma polmonare.

riferimento all'anemia, alla leucopenia ed alla trombocitopenia. Nel ratto la miltefosina (8,25 mg/kg) induce alterazioni delle cellule del Sertoli testicolari, effetto che non è stato evidenziato nel cane, anche ai dosaggi più alti tollerabili. Alle dosi terapeutiche, nell'uomo non sono state notate alterazioni di rilievo della fertilità. Per quanto riguarda i rischi in gravidanza, si veda la nota 57 della Tabella 3 (pag. 64). Nel ratto, trattamenti prolungati ad alti dosaggi, hanno causato fenomeni degenerativi retinici, cosa che non si verifica né nell'uomo né nel cane, per lo meno ai dosaggi terapeutici consigliati (2 mg/kg nel cane, 2,5 mg/kg nell'uomo). Per quanto riguarda la tossicità renale, dosi 4 volte superiori a quella considerata terapeutica nell'uomo, hanno indotto nel ratto alterazioni dei parametri biochimici e morfologici, mentre nel cane questo non si è verificato. Nei pazienti umani oncologici è stato osservato un aumento moderato della creatininemia nel 30% dei casi, quasi sempre reversibile; invece nei pazienti leishmaniotici frequentemente la terapia ha indotto la normalizzazione del suddetto parametro, anche se in qualche caso è aumentato. Tali alterazioni sono state messe in relazione allo squilibrio idro-elettrolitico che si verifica in corso di effetti collaterali gastroenterici, più che ad un danno diretto a livello renale⁶⁴ (Sindermann e Engel, 2006). Negli studi clinici preliminari all'immissione in commercio del Milteforan[®] (VirbacTM), sono stati esclusi cani con creatininemia superiore a 1,4 mg/dl (Bianciardi, 2007). Recentemente è stato segnalato il caso di un paziente umano affetto da leishmaniosi viscerale, moderatamente nefropatico⁶⁵, trattato brillantemente con la miltefosina, con normalizzazione dei parametri renali e dell'emocromo. Nei *trial* clinici sull'uomo i casi di iperazotemia sono stati inferiori al 5%⁶⁶ (Kumar *et al.*, 2007). Per quanto riguarda la tossicità epatica, nel ratto e nel cane non si manifestano significative alterazioni; mentre nell'uomo frequentemente si ha un aumento dell'attività delle transaminasi (soprattutto AST), anche se senza sintomi evidenti (Sindermann e Engel, 2006). Nell'uomo viene raccomandato un utilizzo con cautela della miltefosina, in quanto si tratta di un farmaco relativamente nuovo, di cui si conosce poco, soprattutto per quanto riguarda l'eventuale interazione con altri

⁶⁴ Vomito e diarrea sono gli effetti collaterali più frequentemente osservati anche nel cane con la formulazione in compresse ad uso umano [Impavido[®], ZentarisTM]; il problema è stato sensibilmente ridimensionato con la nuova formulazione in sciroppo, specifica per il cane [Milteforan[®], VirbacTM] (Bianciardi, 2007).

⁶⁵ BUN 142 mg/dl, creatininemia 2,2 mg/dl, proteinuria, microematuria e cilindri eritrocitari urinari.

⁶⁶ Si segnala che il coinvolgimento renale, nella leishmaniosi viscerale umana, non ha assolutamente la stessa incidenza che nel cane: in uno studio su 1.000 pazienti, solo 42 presentavano livelli di BUN > 40 mg/dl, di cui 12 con diminuzione della GFR (Prasad *et al.*, 1992).

farmaci (Kumar *et al.*, 2007). Nell'utilizzo clinico in medicina umana non è ancora stato segnalato alcun fenomeno di farmacoresistenza, anche se, sperimentalmente, sono emersi alcuni potenziali meccanismi di resistenza da parte del parassita e, recentemente, è stato evidenziato un gene di *L. infantum* che può conferire resistenza sia verso la miltefosina che verso la forma attiva dei farmaci antimoniali (Sb^{III}) (Choudhury *et al.*, 2008).

SOSTANZE NATURALI

Molte delle persone che vivono in paesi a forte endemia, fanno affidamento su trattamenti naturali tradizionali. Attualmente viene data molta importanza ai metaboliti secondari vegetali, per quanto riguarda l'attività contro la leishmaniosi: chinoni, alcaloidi, terpeni e derivati fenolici (Mishra *et al.*, 2007). Si hanno esclusivamente dati sperimentali *in vitro* o negli animali di laboratorio. Tra le sostanze più convincenti ci sono la luteolina (un flavonoide che inibisce la crescita di promastigoti di *L. donovani* [Mittra *et al.*, 2000]) e l'aglio. Quest'ultimo manifesta interessanti proprietà immunomodulatorie, in quanto nel modello murino-*L. major* è stato dimostrato che aumenta la fagocitosi dei macrofagi, il *killing* dei parassiti (probabilmente per una stimolazione del NO) e le proprietà leishmanicide dell'AnM (Ghazanfari *et al.*, 2006); l'utilizzo pratico nel cane è di utilità scarsa o nulla (Mancianti, 2008, comunicazione personale).

2.5.3. Immunoterapia ed immunomodulatori

2.5.3.1. Glicocorticoidi

Spesso vengono utilizzati nel tentativo di controllare i fenomeni immunopatologici, soprattutto quelli relativi al deposito di immunocomplessi e nelle forme con forte componente autoimmunitaria (Alvar *et al.*, 2004): prednisone e prednisolone sono stati utilizzati a dosi non immunosoppressive di 1,2 mg/kg/die per 40 giorni in associazione all'AnM; probabilmente tali dosaggi hanno dato buoni risultati più per le proprietà antiflogistiche che per l'inibizione della produzione anticorpale. Tali farmaci devono essere usati con moderazione e cautela, per non correre il rischio di aggravare la funzionalità renale: per la loro azione catabolica, per l'induzione di ipoalbuminemia, e per le stesse proprietà immunosoppressive (inibiscono la produzione di IL-1 dai monociti attivati ed ostacolano quella di IL-2 dai

linfociti T *helper*) (Mancianti e Bizzeti, 2000). Le lesioni cutanee in corso di leishmaniosi possono migliorare con la somministrazione di prednisolone, ma la carica parassitaria può risultare aumentata (Rüfenacht *et al.*, 2005). Nei topi sperimentalmente infetti e trattati per lunghi periodi di tempo con desametasone, si ha un incremento della carica parassitaria nella milza (Gangneux *et al.*, 1999[2]). Inoltre nel cane (come nell'uomo e nel topo) l'immunità cellulo-mediata è d'importanza fondamentale nel controllo della leishmaniosi (Moreno e Alvar, 2002), ed i glicocorticoidi determinano un'inibizione di questa immunità, influenzando l'equilibrio ospite-parassita (nell'infezione sperimentale canina per via endovenosa, il trattamento con glicocorticoidi per 5 mesi ha promosso tutti gli aspetti dell'infezione da *Leishmania* [Poot *et al.*, 2005]). Secondo Pizzirani (2001) l'utilizzo dei corticosteroidi rimane controverso: a dosaggio immunosoppressivo (prednisone 2,2 mg/kg BID) e per lunghi periodi di tempo (6 settimane) possono provocare alterazioni renali; mentre dosaggi più contenuti e per tempi più limitati non inducono proteinuria; alcune delle proprietà immunosoppressive di questi farmaci (che determinano diminuzione del tasso anticorpale ed il conseguente aumento dell'antigene) sono considerazioni che dovrebbero limitare l'uso dei corticosteroidi in patologie renali associate a leishmaniosi; il quadro istologico di glomerulopatia a cambiamenti minimi (*Minimal Change Glomerulopathy*) in corso di leishmaniosi canina, può spiegare l'indubbia efficacia che i corticosteroidi manifestano nella pratica clinica in alcuni pazienti renali; l'utilizzo di tali farmaci andrebbe preso in considerazione in questi casi o nei pazienti che non rispondono alle terapie evidenziando una costante progressione della malattia renale. Adamama-Moraitou e coll. (2005) riportano che l'indicazione più razionale per l'utilizzo dei cortisonici in corso di leishmaniosi canina, è la grave epistassi, tramite un'iniziale iniezione EV in bolo di desametasone, seguita dalla somministrazione orale di prednisolone, a dosaggio antiinfiammatorio od immunosoppressivo, per alcuni giorni. Gli Autori hanno quindi condotto uno studio clinico sull'utilizzo di questi distinti dosaggi: all'inizio della terapia antinfiammatoria (prednisolone 0,5 mg/kg OS BID per 7 giorni) la maggior parte dei soggetti (8 su 11 = 72,7%) presentava anemia; dopo 7 giorni di sospensione, tutti i soggetti erano anemici ed è stata applicata la terapia immunosoppressiva (prednisolone 2 mg/kg OS BID per 7 giorni). L'anemia non è migliorata dopo i due periodi, per cui gli Autori concludono che, almeno per tali regimi terapeutici di breve durata, i cortisonici non la risolvono. Inoltre, in considerazione delle evidenze sperimentali, per cui il metabolismo di

Leishmania risulta stimolato dal ferro ed inibito dal rame, gli Autori hanno anche valutato le quote di questi metalli nel plasma, scoprendo che durante la terapia con prednisolone, soprattutto a dosaggio immunosoppressivo, il ferro era sensibilmente aumentato ed il rame diminuito, suggerendo che la terapia cortisonica possa favorire lo sviluppo del parassita.

2.5.3.2. Domperidone

Gli studi di Gómez-Ochoa e coll. (2003; 2007) sembrerebbero aprire la strada al domperidone nella terapia immunostimolante in corso di leishmaniosi canina. Nel primo studio, gli Autori hanno dimostrato, nel criceto infetto da *L. infantum*, un ruolo protettivo della lattazione, proponendo una relazione tra l'iperprolattinemia e l'incremento del *killing* del parassita. La prolattina (PRL) ha un ruolo centrale nei meccanismi immunitari, benché il meccanismo d'azione in questo senso sia poco conosciuto; l'ormone, la cui azione principale nei mammiferi è la stimolazione della lattazione, è oggi considerato una citochina proinfiammatoria di derivazione linfocitaria: aumenti sierici di PRL determinano incrementi delle sottoclassi linfocitarie Th1 CD4⁺ e del rilascio di IL-2, IL-12, INF- γ e TNF- α , con stimolazione delle cellule NK, dell'attivazione macrofagica e successiva diminuzione dei linfociti Th2 CD4⁺ e del TNF- β . Nel secondo studio gli Autori hanno quindi testato il domperidone (1 mg/kg OS BID per 1 mese in monoterapia) su cani leishmaniotici: si tratta di un farmaco procinetico ed antiemetico, antagonista dei recettori dopaminergici D2, azione che si estrinseca con il rilascio di serotonina, a cui segue la produzione di PRL. Il *follow-up* post-terapia è durato 12 mesi, durante i quali i cani sono stati controllati diverse volte dal punto di vista clinico, sierologico, biochimico ed immunologico. Il domperidone è stato efficace nel controllo e nella riduzione dei segni clinici e del titolo anticorpale: diminuzioni significative degli anticorpi sierici sono state osservate nel 74,3% dei cani con segni clinici moderati ed il 40% si è sieronegativizzato. Nei pazienti con segni clinici gravi ed alto titolo anticorpale, il miglioramento clinico si è verificato nell'86% dei soggetti ed il titolo è diminuito nel 38% di essi. Si è rilevato anche un incremento significativo della risposta immunitaria cellulare, come evidenziato dall'LST e da un test di proliferazione linfocitaria (LPA). Tra i vantaggi di un eventuale utilizzo del domperidone, da solo od associato ad altri farmaci, ci sono il basso costo, la somministrazione orale, e, come evidenziato nello studio, l'assenza di effetti collaterali, ciò che ha permesso agli Autori di trattare anche

cani con insufficienza renale⁶⁷. Sono comunque necessari ulteriori approfondimenti, anche per individuare il dosaggio più opportuno.

2.5.3.3. Altri approcci immunoterapici

Sfruttando i risultati delle ricerche inerenti la vaccinazione, risultati, peraltro, non molto confortanti, sono stati tentati altri approcci immunoterapeutici, che si basano soprattutto sull'utilizzo di associazioni tra farmaci leishmanicidi classici e frazioni di antigeni di *Leishmania* (Alvar *et al.*, 2004). Neogy e coll. (1994) riportarono il successo clinico e l'assenza di recidive per 6 mesi della terapia combinata AnM + LiF2⁶⁸, comparandola con i risultati più modesti dei due trattamenti separati. Recentemente Miret e coll. (2008) hanno comparato una terapia a base di AnM associato ad un vaccino ricombinante di seconda generazione (Leish-110f[®]), insieme ad un adiuvante (MPL-SE[®]), con la terapia a base di solo AnM, ottenendo notevoli risultati dal punto di vista clinico e laboratoristico e, in due casi, anche la negativizzazione della PCR (benché i soggetti siano rimasti infettanti, come dimostrato dalla xenodiagnosi). Inoltre nel gruppo di cani trattato con l'associazione, i casi di morte sono stati inferiori e la risposta cellulo-mediata (LST) migliore, rispetto al gruppo trattato col solo AnM.

2.5.4. Patologia renale

Circa il 50% dei cani con leishmaniosi presenta un grado maggiore o minore d'interessamento renale. Di questi soggetti il 30% ha insufficienza renale ed il 20% ha una glomerulopatia. Nei casi avanzati, alcuni di questi cani sviluppano una sindrome nefrosica. Circa il 60% dei cani con insufficienza renale muore, spontaneamente o per eutanasia, con un periodo di sopravvivenza che oscilla tra 4 mesi (nei cani con insufficienza renale) e 12 mesi (nei cani con malattia glomerulare). Il 40% dei cani con leishmaniosi e malattia renale risponde bene al trattamento specifico. I livelli di proteinuria sono indicativi del grado di lesione glomerulare. Il ritrovamento precoce di una quantità anomala di proteine urinarie, specialmente in cani che ancora non presentano insufficienza renale, è fondamentale per cercare di rallentare la

⁶⁷ Benché 2 cani, dei 34 del gruppo formato da soggetti con titolo elevato e sintomatologia più grave, siano stati sottoposti ad eutanasia nel corso della terapia, per un aggravamento dell'insufficienza renale.

⁶⁸ *Leishmania infantum*-derived Fraction 2.

progressione delle lesioni renali secondarie alla leishmaniosi. La determinazione del rapporto PU/CU è molto importante per valutare il danno glomerulare (Roura, 2001).

In caso di proteinuria con PU/CU > 0,7 o se è presente ipercreatininemia, Zini e coll. (2007) suggeriscono l'utilizzo dell'enalapril (ACE-inibitore) al dosaggio di 0,5 mg/kg OS SID, tenendo sotto controllo l'azotemia, perché, per le loro proprietà vasodilatatorie, gli ACE-inibitori possono ridurre eccessivamente la perfusione renale (e questo in genere si verificherebbe durante le prime due settimane di trattamento); se la funzionalità organica risultasse deteriorata, potrebbe essere necessario ridurre i dosaggi o sospendere il trattamento. Gli eventuali effetti benefici sulla proteinuria non si manifestano prima di 1-2 mesi dall'inizio della terapia. Gli autori consigliano anche bassi dosaggi di acido acetilsalicilico (per ridurre l'attivazione piastrinica, in quanto nelle nefropatie proteinodisperdenti l'ipercoagulabilità rappresenta un problema; 0,5 mg/kg OS SID), anche in presenza d'ipercreatininemia. L'eventuale impiego di una dieta ipoproteica, che può essere utile per ridurre la proteinuria, va valutata caso per caso, dato che spesso i cani leishmaniotici manifestano gradi più o meno elevati di riduzione delle masse muscolari, e quindi questo tipo di regime alimentare potrebbe peggiorare le condizioni fisiche. In certi casi sono risultati utili gli acidi grassi essenziali ω -3, grazie ad un effetto positivo sull'emodinamica glomerulare⁶⁹.

La maggior parte dei cani leishmaniotici è ipertesa (61,5%). Raramente l'ipertensione non è associabile a lesioni renali. La conseguenza più frequente di questo stato è l'ipertrofia ventricolare sinistra (91,4%), raramente si hanno anche ripercussioni oculari (5,7%). L'ipertensione non si presenta esclusivamente negli stadi più gravi della malattia renale secondaria alla leishmaniosi, ma anche nelle fasi più precoci, prima cioè che l'iperazotemia possa essere rilevata, magari quando è presente solo un grado moderato di proteinuria (Cortadellas *et al.*, 2006). Zini e coll. (2007)

⁶⁹ Sperimentalmente è risultato che cani con ridotta funzionalità renale che assumono supplementazioni di acidi grassi poliinsaturi ω -3 (come l'olio di pesce) hanno meno lesioni strutturali renali, meno proteinuria ed una maggiore preservazione della filtrazione glomerulare, rispetto ai soggetti che non li assumono. Invece la supplementazione di acidi grassi poliinsaturi ω -6 (come l'olio di zafferanone) determina la progressione del deterioramento della funzionalità renale, con proteinuria, evidenze morfologiche di danno glomerulare e tubulointerstiziale e l'aumento della prevalenza dell'insufficienza renale all'ultimo stadio (Brown *et al.*, 2000). La proporzione ottimale ω -6/ ω -3 alimentari dovrebbe essere 5/1; se è superiore a 15/1 è possibile la somministrazione di 1-5 mg/die di ω -3 (Barsanti, 2003).

consigliano di misurare la pressione sistemica e di trattare l'eventuale ipertensione⁷⁰: amlodipina besilato (calcio-bloccante; 0,1-0,5 mg/kg OS SID o BID) associata all'ACE-inibitore, perché la prima può determinare un aumento della pressione glomerulare. Anche con quest'associazione è opportuno monitorare la creatininemia per il rischio di un'eccessiva riduzione della pressione di filtrazione glomerulare⁷¹. In alcuni casi questo trattamento non riesce a ridurre la pressione sistemica, per cui potrebbe essere opportuno passare ad un altro tipo di terapia (per es.: bloccanti β -adrenergici, antagonisti dell'aldosterone).

Nella gestione del paziente con insufficienza renale cronica (IRC), deve essere prevenuta il più possibile la disidratazione, per cui dovrebbe sempre essere garantito il libero accesso all'acqua e si dovrebbero prevenire tutte le possibili cause di iperazotemia prerenale, come un'alimentazione scorretta che possa indurre gastroenterite. Alcuni soggetti, anche bevendo, non riescono a mantenere un sufficiente grado di idratazione; per questo si possono somministrare fluidi, anche per via sottocutanea. La quantità di fluidi da integrare dovrebbe essere determinata caso per caso in base alla quantità di acqua assunta spontaneamente ed al grado di iperazotemia. È possibile iniziare con una quantità di fluidi pari a 20-60 ml/kg SC ogni 1-3 giorni (Ringer lattato od altre soluzioni alcalinizzanti per prevenire l'acidosi metabolica). L'anoressia che spesso accompagna l'IRC, se dovuta alla nausea, può essere combattuta con farmaci H2 antagonisti come la ranitidina (1-2 mg/kg q12-24 hh) o la famotidina (0,5-1 mg/kg q12-24 hh), in alternativa può anche essere utilizzata la cimetidina; tali farmaci vengono però in parte escreti per via renale, per cui è importante ricordare che il dosaggio dovrebbe essere ridotto del 50-75% per la ranitidina e del 10-25% per la famotidina. Il dosaggio ed il numero di somministrazioni giornaliere di questi farmaci, col tempo, possono essere ridotti gradualmente, in base alle esigenze individuali. La metoclopramide può essere utilizzata come antiemetico (0,1-0,4 mg/kg q8 hh), ma siccome anche questo farmaco viene escreto in parte per via renale, può essere necessario ridurre la dose anche del

⁷⁰ La terapia contro l'ipertensione è indicata quando la pressione supera i 180 mm Hg (metodo Doppler), oppure è compresa tra 150 e 179 ma ci sono segni clinici od alterazioni di laboratorio compatibili con l'ipertensione sistemica, come emorragie retiniche, cardiopatia ipertensiva, segni neurologici corticali, proteinuria, iperazotemia.

⁷¹ Le segnalazioni bibliografiche degli effetti degli ACE-I sulla creatininemia non sono sempre concordi: il captopril ed il benazepril determinano aumenti moderati, non sempre l'enalapril (Braun *et al.*, 2003).

50% in base al grado di IR. L'iperfosfatemia può essere combattuta con prodotti a base di idrossido di alluminio (90 mg/kg/die). Altri leganti del fosforo utilizzabili sono il carbonato di calcio e l'acetato di calcio, anche se la somministrazione può causare ipercalcemia: devono essere somministrati coi pasti (60 mg/kg/die acetato di calcio, 100 mg/kg/die carbonato di calcio). L'acetato di calcio è considerato più efficace e meno pericoloso. Anche il sucralfato può essere utilizzato come legante del fosforo. Negli animali che assumono leganti del fosforo, la calcemia e la fosforemia dovrebbero essere determinate ogni 2-4 settimane per valutare la dose efficace. Per combattere l'anemia legata all'IRC, talvolta viene utilizzata l'eritropoietina ricombinante umana, ma, in base alla non rara induzione di effetti collaterali anche gravi (reazioni anafilattiche, disturbi comportamentali, diminuzione paradossa dell'ematocrito a causa dello sviluppo di anticorpi anti-EPO umana⁷²), questa terapia dovrebbe essere limitata ai casi molto gravi, in cui l'eccessiva diminuzione dell'ematocrito (< 20%) è di per sé pericolosa per la vita (Barsanti, 2003).

⁷² Gli anticorpi si sviluppano nel 60% dei cani trattati con EPO ricombinante umana entro 4-13 settimane dall'inizio della terapia.

2.6. Profilassi

2.6.1. La lotta contro il vettore

Il controllo preventivo delle leishmaniosi (quella canina e le forme umane) tramite la lotta alle popolazioni di flebotomi è una questione complicata. Nei Paesi in cui sono state condotte campagne contro la malaria tramite l'utilizzo di insetticidi con effetto residuale nelle abitazioni, è stata osservata anche una certa riduzione dell'incidenza dei casi di leishmaniosi, soprattutto nelle zone in cui predominano le specie strettamente endofile. La distruzione completa dell'habitat, seguita dallo sfruttamento da parte di insediamenti umani, è l'unico intervento di tipo permanente che può essere applicato per combattere i flebotomi, com'è stato fatto con successo - ma con spese ingenti - in alcune aree dell'ex Unione Sovietica, endemiche per leishmaniosi cutanea (*L. major* trasmessa da *Ph. papatasi*). Benché questi insetti siano generalmente sensibili ai comuni insetticidi, non va sottovalutata la possibilità che compaiano fenomeni di farmacoresistenza, soprattutto quando tali prodotti chimici vengono utilizzati su ampia scala. Le misure di controllo non possono che rivolgersi alla lotta nei confronti dei flebotomi adulti, considerata l'ampia possibilità di diffusione delle forme immature, anche in siti ben poco raggiungibili da eventuali insetticidi utilizzati nell'ambiente esterno. Come per la malaria, la protezione degli ambienti chiusi può essere ottenuta più agevolmente tramite reti plastiche o metalliche a maglia stretta (non superiore a 2 mm) e con tende impregnate di insetticidi, soprattutto piretroidi sintetici residuali, come la deltametrina e la permetrina (Killick-Kendrick, 2002; Alvar *et al.*, 2004).

Per quanto riguarda specificamente la leishmaniosi canina, l'avvento di formulazioni di insetticidi più efficienti e persistenti, ha permesso di riconsiderare le strategie di lotta al vettore, che oggi si basano essenzialmente sulla prevenzione delle punture dei flebotomi tramite l'applicazione diretta di insetticidi sul cane; in questo modo si può ottenere l'interruzione della trasmissione e quindi il controllo della malattia. Negli anni più recenti, ha ricevuto molta attenzione l'utilizzo topico di collari e prodotti liquidi: questi sistemi consentono di ridurre il numero delle punture e quindi conferiscono una certa protezione individuale. Fondamentalmente si tratta di due tipi di effetti: uno in senso repellente, per cui la trasmissione viene interrotta in quanto il

flebotomo non compie il pasto di sangue (effetto *anti-feeding*), ed un altro in senso insetticida, in base al quale gli insetti muoiono in seguito al pasto od al contatto con la superficie corporea trattata. In entrambi i casi, si dovrebbe interrompere il ciclo di trasmissione: nel primo caso in maniera più immediata, più ritardata invece nel secondo caso. La difficoltà di mantenere in laboratorio ampie popolazioni di flebotomi, fa sì che i test per valutare l'efficacia degli insetticidi, possano essere condotti solo su numeri limitati di cani: ogni saggio richiede da 100 a 200 femmine di flebotomo, che si pensa sia più del doppio del numero richiesto per mantenere una singola colonia; per non parlare poi del numero di ripetizioni dei singoli test onde valutare la durata media della protezione. Uno studio simile richiede circa 2000 flebotomi al mese per ogni cane (Alvar *et al.*, 2004).

In prove di laboratorio e di campo, si sono ottenuti buoni risultati con l'utilizzo di collari di cloruro di polivinile (PVC) impregnati di deltametrina (Scalibor[®], Intervet[™]) (Alvar *et al.*, 2004): l'insetticida viene rilasciato progressivamente dalla matrice plastica, come risultato della frizione continua tra collare e mantello del cane; la deltametrina penetra nel tessuto cellulare sottocutaneo e si distribuisce nel grasso, coprendo l'intera superficie dell'animale in 1-2 settimane, benché le maggiori concentrazioni siano rilevabili nelle zone del collo e della testa (Halbig *et al.*, 2000). I collari in 34 settimane hanno ridotto le punture del 98% e l'effetto insetticida è stato del 66% senza effetti collaterali di rilievo (Killick-Kendrick *et al.*, 1997; David *et al.*, 2001; Reithinger *et al.*, 2001). L'utilizzo dei collari su larga scala in Campania nel corso di due stagioni di trasmissione, ha consentito di ottenere una diminuzione dell'incidenza dei casi di leishmaniosi canina (Maroli *et al.*, 2001). Un analogo intervento in diversi villaggi del nord-ovest dell'Iran, ha permesso, non solo di proteggere i cani, ma anche di ottenere una significativa riduzione dell'incidenza della malattia nei bambini (Mazloumi-Gavani *et al.*, 2002).

Buoni risultati sono stati ottenuti anche con una formulazione *spot-on* a base di permetrina (65%, Exspot[®], Schering-Plough[™]), da applicare sul dorso del cane direttamente sulla cute: l'insetticida si distribuisce su tutto il corpo in una settimana; la riduzione totale della capacità di *feeding* dei flebotomi è risultata di circa il 77% nel corso di 7 settimane, con un effetto insetticida di circa il 67% un mese dopo l'applicazione (Alvar *et al.*, 2004). Anche nell'utilizzo di campo è risultato che l'uso

regolare della formulazione durante i mesi ad alto rischio per leishmaniosi canina, può essere una strategia utile per ridurre la prevalenza della malattia nelle aree iperendemiche (Giffoni *et al.*, 2002). Anche la formulazione a base di permetrina (50%) ed imidacloprid⁷³ (10%) (Advantix[®], Bayer[™]) ha dimostrato una buona efficacia: Miró e coll. (2007) hanno rilevato che la soluzione offre un efficace effetto repellente contro *Ph. perniciosus*, a partire da 24 ore dopo l'applicazione sul cane e per un periodo di 21 giorni, che gli autori consigliano come intervallo di applicazione del prodotto per ridurre significativamente il rischio delle punture dei flebotomi nelle aree endemiche. Ad analoghe conclusioni sono arrivati anche Otranto e coll. (2007), ottenendo dei risultati molto buoni con applicazioni ad intervalli di 15 giorni (100% d'efficacia) e molto buoni ad intervalli di 28 giorni (88,9%). Recentemente in Liguria Ferroglio e coll. (2008) hanno ottenuto analoghi buoni risultati sia con l'utilizzo del collare a base di deltametrina, sia con la formulazione *spot-on* a base di permetrina. Una sperimentazione con uno spray a base di permetrina e piriproxifene (Duowin[®], Virbac[™]) ha rilevato il 71,4% di effetto repellente a 21 giorni, ma solo il 7,2% di effetto insetticida; tale bassa percentuale probabilmente è dovuta alla repellenza stessa, che non permette il contatto prolungato tra l'insetticida ed i flebotomi (Molina *et al.*, 2006).

2.6.2. Vaccinazione

Le ricerche sulla vaccinazione contro la leishmaniosi sono molto intense, in quanto si prevede che sia il miglior metodo per la prevenzione della patologia nel cane e quindi anche di quella nell'uomo. Un vaccino efficace dovrebbe essere in grado di indurre un'immunità cellulomediata di forte intensità e di lunga durata; un tale approccio teoricamente è percorribile, per il fatto che nelle aree endemiche c'è un grande numero di cani infetti, ma non tutti sviluppano la malattia, così come è evidente che in queste zone i cani naturalmente infetti mostrano risposte linfoproliferative e la positività all'LST. Inoltre la possibilità di indurre l'immunità cellulomediata in cani sperimentalmente infetti, supporta l'ipotesi della fattibilità della vaccinazione contro la leishmaniosi canina. Sono stati testati molti antigeni e protocolli immunizzanti: parassiti morti interi o frazionati, parassiti vivi attenuati, proteine ricombinanti e sintetiche, antigeni non proteici, immunogeni espressi in virus

⁷³ Insetticida piuttosto potente contro le pulci.

e batteri e DNA “nudo”. La maggior parte di questi vaccini sono stati testati in modelli murini, alcuni nell’uomo e pochi nel cane (Alvar *et al.*, 2004), anche se ultimamente stanno aumentando i test diretti sulla specie canina. Una prima prova per immunizzare il cane, applicando un protocollo che aveva avuto successo nel topo, non solo non funzionò, ma determinò una forma grave di malattia, probabilmente per le differenze tra cane e topo (Dunan *et al.*, 1989). Successivi tentativi risultarono in analoghi insuccessi, probabilmente anche perché nelle prove di campo vengono impiegati molti animali, mentre in laboratorio il numero è giocoforza ridotto; inoltre queste discrepanze possono essere spiegate anche con le ovvie differenze tra l’infezione conferita sperimentalmente con promastigoti in coltura e quella dovuta naturalmente ai promastigoti provenienti dalla proboscide dei flebotomi vettori (Barbiéri, 2006). In questo senso, bisogna anche tenere presente che gli estratti salivari di diverse specie di flebotomi, esprimono un potere antigenico specie-specifico, con parziali similitudini solo tra specie appartenenti allo stesso sottogenere (per es. tra *Ph. perniciosus* e *Ph. halepensis* [sottogenere *Larroussius*]) (Volf e Rohousová, 2001).

Dopo 25 anni di ricerche, il primo vaccino al mondo contro la leishmaniosi canina, è stato autorizzato dal Ministero dell’Agricoltura Brasiliano: si tratta di Leishmune[®] (Fort Dodge Animal Health[™]). È costituito da una frazione purificata, isolata da *L. donovani*, più un adiuvante alla saponina. La frazione purificata, detta *fucose mannose ligand* (FML), è un complesso glicoproteico che è molto attivo nell’inibizione dell’infezione da *Leishmania* nei macrofagi del topo. Il modello murino ed i *trial* di fase III, indicano che il vaccino è un’opzione promettente per la prevenzione della leishmaniosi canina in Brasile: ha indotto fino al 92% di protezione in cani naturalmente infetti sottoposti a *follow-up* di 2 anni. Inoltre recentemente è stato evidenziato il suo potenziale come dispositivo che blocca la trasmissione (suggerendo la sua utilità nel controllo della leishmaniosi viscerale zoonosica) ed anche come immunoterapico in cani infetti asintomatici, anche se al momento, in accordo col produttore, è consigliato solo in cani sieronegativi ed asintomatici (Dantas-Torres, 2006; Barbiéri, 2006).

La strada per addivenire ad un vaccino realmente efficace pare essere aperta, anche se sono necessari maggiori approfondimenti sull’immunologia della leishmaniosi canina, senza i quali i risultati rischiano di restare solo parzialmente

soddisfacenti. Inoltre, per l'utilizzo routinario, è necessario che alcuni dubbi vengano risolti: devono essere testati molti più cani in prove di campo; sono necessari periodi di *follow-up* molto più estesi, per la prevalente stagionalità della trasmissione dell'infezione. Ci sono poi alcune malattie croniche od asintomatiche, come l'ehrlichiosi e le elmintosi, che possono interferire con l'immunità (per es.: *Ehrlichia* può inibire l'espressione degli antigeni dell'MHC di classe II): tali situazioni vanno tenute presenti allorché si progettano i vaccini (Barbiéri, 2006).

3. DIAGNOSI DI LABORATORIO

Gran parte dei segni clinici che possono caratterizzare la leishmaniosi, sono comuni anche ad altre patologie, altrettanto frequenti nelle aree endemiche, e, tra l'altro, possono anche essere concomitanti alla leishmaniosi stessa (Ciaramella e De Luna, 1999). In una recente indagine svolta in canili portoghesi, è emerso che oltre il 45% di cani non infetti da *Leishmania*, ha segni clinici (alterazioni cutanee, linfadenomegalia e perdita di peso) del tutto sovrapponibili a forme di leishmaniosi (Maia *et al.*, 2007). Per questi motivi, una tabella riassuntiva in senso diagnostico-differenziale, pare a questo punto opportuna (Tabella 5).

Tabella 5 - Diagnosi differenziale della leishmaniosi canina (Ciaramella e De Luna, 1999).

Malattia	Quadro clinico	Rilievi di laboratorio
EPATOOZONOSI (Subacuta-cronica)	Esposizione alle zecche; diarrea, anoressia, scolo nasale ed oculare, paraparesi, dimagrimento, osteoalgia e mialgia, febbre, talora linfadenomegalia	Neutrofilia, monocitosi, gametociti nei neutrofili e nelle fibrocellule muscolari, ipergammaglobulinemia, modica anemia
RICKETZIOSI (Acuta-cronica)	Esposizione alle zecche; febbre 39,5 - 40 °C, anoressia, profonda depressione, mialgia e artralgia, congiuntivite, deficit vestibolari, linfadenomegalia, aritmie, dispnea, edemi	Leucocitosi, monocitosi, anemia normocromica normocitica, trombocitopenia; aumento di ALT, AST, GGT, BUN; test sierologici specifici (IFAT > 1/128)
EHRlichiosi (Acuta-cronica)	Esposizione alle zecche, febbre superiore a 40 °C, depressione, anoressia, mucose pallide, tendenza al sanguinamento, splenomegalia, linfadenomegalia, uveite, segni neurologici	Marcata pancitopenia; aumento di ALT, AST, ALP; ipergammaglobulinemia, test sierologici specifici (IFAT > 1/100)
BABESIOSI (Iperacuta-acuta-cronica)	Esposizione alle zecche, depressione, febbre, anoressia, mucose pallide, itteriche, splenomegalia, petecchie, emoglobinuria, DIC. Portatori cronici	Anemia rigenerativa, test di Coombs positivo, bilirubina aumentata, presenza dei parassiti nei globuli rossi, test sierologici specifici (IFAT > 1/140)
LINFOMA (Subacuta-cronica)	Linfadenomegalia sistemica o regionale, dimagrimento, mucose pallide, splenomegalia, epatomegalia, diarrea	Presenza di cellule linfomatose nel puntato linfonodale, midollare e/o sangue circolante; aumento di ALT, AST, ALP, bilirubina, BUN e calcio; anemia normocromica normocitica
DERMATITE ALLERGICA ALIMENTARE (Cronica)	Prurito non stagionale, eritema diffuso coinvolgente l'addome, il dorso, la testa e la regione perianale, cui fa seguito alopecia, lichenificazione ed iperpigmentazione, otite esterna	Possibile eosinofilia e positività ai test intradermici; test dietetico

Malattia	Quadro clinico	Rilievi di laboratorio
DERMATITE ALLERGICA DA MORSO DI PULCI (Cronica)	Esposizione alle pulci, prurito stagionale, eritema diffuso, talvolta crostoso localizzato alle regioni inguinali, perineali, dorso - lombari e agli arti posteriori. Pelo spezzato	Presenza di pulci o di detriti (feci); test intradermici
DERMATITE ATOPICA (Cronica)	Alopecia periorbitale, prurito, leccamento delle estremità delle zampe, crisi di starnuti, lacrimazione, otite esterna, adenite perianale	Test intradermico
DEMODICOSI (Subacuta-cronica)	Animali giovani o immunodefediti (l'affezione può essere concomitante alla leishmaniosi, per l'immunodeficienza che l'accompagna); eritema periorbitale o follicolite diffusa pustolosa, in genere non pruriginosa; pododermatite	Presenza di <i>Demodex canis</i> al raschiato cutaneo [foto di un cane con demodicosi]
ROGNA SARCOPTICA (Subacuta-cronica)	Animali giovani o immunodefediti; lesioni (papule e croste) inguinali, ascellari, margini dei padiglioni auricolari o diffuse, in genere pruriginose. Contagiosità	Presenza di <i>Sarcoptes scabiei</i> al raschiato cutaneo

Secondo Blavier e coll. (2001) ogni animale malato dovrebbe essere considerato potenzialmente infetto fino a prova contraria (data dai test diagnostici). Nelle aree non endemiche la diagnosi può essere molto più difficile, in particolare in presenza di forme atipiche od inconsuete. Ma in considerazione della sempre maggiore diffusione della patologia in aree in precedenza considerate indenni, ed anche dei possibili viaggi in aree maggiormente a rischio, il clinico dovrebbe tenere in considerazione la leishmaniosi ogni qualvolta si trovi davanti dei disordini infiammatori di qualsiasi organo od apparato (Blavier *et al.*, 2001).

Nell'approccio clinico-diagnostico alla leishmaniosi canina, gli esami di laboratorio hanno un ruolo di primaria importanza, sia come conferma del sospetto clinico, sia per il loro valore di giudizio a fini prognostici e nel monitoraggio della terapia. Si possono distinguere in aspecifici e specifici, a seconda che valutino le alterazioni indirettamente attribuibili alla malattia, oppure la presenza del parassita nell'organismo (Ciaramella e De Luna, 1999).

3.1. Esami aspecifici

Tabella 6 - Intervalli di frequenza dei rilievi di laboratorio aspecifici in corso di leishmaniosi canina (%) (Noli, 1999).

Parametro	Frequenza (%)
Iperglobulinemia	70 - 100
Basso rapporto albumina/globuline	76
Ipoalbuminemia	68 - 94
Elevati livelli sierici di proteine totali (fino a 13 g/l)	63,3 - 91
Anemia normocitica, normocromica, iporigenerativa	21 - 94,2
Leucopenia (conteggio dei linfociti normale o basso)	22
Leucocitosi con spostamento a sinistra	8 - 24
Trombocitopenia	29,3 - 50
Iperazotemia e creatininemia	38 - 45
Aumento degli enzimi epatici	16 - 61
Proteinuria	29 - 91
Positività dell'ANA-test	31 - 47
Positività del test di Coombs (soprattutto debole)	10 - 84

3.1.1. Esame emocromocitometrico

L'esame emocromocitometrico è sicuramente quello più aspecifico, alla base di tutte le indagini laboratoristiche. L'anemia (diminuzione RBC e/o PCV e/o Hgb) è un reperto piuttosto frequente in corso di leishmaniosi, e può essere sospettata già in corso di esame clinico, sia per il pallore delle mucose apparenti, sia per l'astenia generale (Boni *et al.*, 1999). Bizzeti e coll. (1989: 170 casi) la riportano in circa il 53% dei casi sintomatici, con una media di RBC di $4.360.000/\text{mm}^3$, mentre Ciaramella e coll. (1997: 150 casi) in circa il 60% (58% diminuzione RBC, 60% diminuzione emoglobina). Altre segnalazioni invece riportano percentuali più modeste (20-30%: Amusategui *et al.*, 2003). In genere l'anemia è scarsamente o non rigenerativa, normocitica normocromica. La patogenesi dell'anemia è multifattoriale: solitamente dipende da fenomeni immunomediati (anche autoimmunitari), anche se è stato chiamato in causa il possibile ruolo dei radicali liberi dell'ossigeno (vengono prodotti in grandi quantità anche dai fagociti circolanti, provocano alterazioni della membrana degli eritrociti con conseguente loro demolizione da parte del sistema reticolo-istiocitario) (Ciaramella e De Luna, 1999). Chiaramente l'anemia può essere anche dovuta alla perdita di sangue (per es.: quando c'è epistassi intensa) e può dipendere dall'invasione diretta del midollo osseo da parte dei parassiti. Nelle fasi più avanzate della malattia, quando subentra l'insufficienza renale, un ruolo importante è rivestito dalla ridotta secrezione di eritropoietina da parte dei reni lesi. Secondo quanto riportato da Amusategui e coll. (2003), i valori di RBC, PCV e Hgb sono correlati significativamente con la forma clinica della malattia, col titolo anticorpale e con l'alterazione dell'elettroforetogramma.

Ci può essere trombocitopenia, leucogramma da stress/infiammazione (neutrofilia e monocitosi con linfopenia ed eosinopenia), ma anche leucopenia (Paltrinieri *et al.*, 2007). I soggetti asintomatici presentano i più bassi valori medi di WBC, granulociti e monociti; inoltre i granulociti (in particolare gli eosinofili) ed i monociti sono correlati con gli aumenti delle globuline β . L'associazione dell'eosinofilia con la forma clinica più schiettamente cutanea, farebbe pensare ad una possibile componente allergica in seno alla leishmaniosi, che può essere la conseguenza dell'infezione cronica, con un basso grado di degranulazione mast-cellulare e conseguente richiamo di eosinofili dal midollo osseo, pur in assenza di

prurito (Amusategui *et al.*, 2003). In genere, comunque, all'inizio della malattia è più frequente la rilevazione di leucocitosi, mentre nelle fasi più avanzate prevale il riscontro di leucopenia (Boni *et al.*, 1999).

3.1.2. Velocità di eritrosedimentazione

Si tratta di un test molto generico che si basa sulla misurazione del tempo che impiegano gli eritrociti a sedimentare in un campione di sangue con anticoagulante. Nella leishmaniosi l'aumento della VES (che normalmente è di 2-4 mm nella prima ora) è quasi sempre presente e dipende da vari fattori, come l'anemia, l'aumento delle globuline e del fibrinogeno, la presenza di immunocomplessi, la diminuzione dell'albumina. Sono tutti fattori che contribuiscono all'aggregazione ed alla formazione di *rouleaux* dei globuli rossi (Ciaramella e De Luna, 1999). L'aumento della VES si verifica in genere in concomitanza di fenomeni infiammatori/infettivi e tumorali. In circa il 42% dei casi la VES supera i 50 mm dopo la prima ora; nel 30% dei casi supera i 100 mm (Pizzirani e Saponetto, 1989[1]).

3.1.3. Proteine totali e sieroelettroforesi

La concentrazione delle proteine totali solitamente è misurata tramite spettrofotometria, utilizzando la metodica al biureto: essa prevede l'impiego di un reagente composto da ioni rame ad un pH alcalino; quando il siero od il plasma vengono miscelati al reagente, si forma un complesso di colore viola, la cui intensità aumenta col numero dei legami peptidici, ovvero con la quantità delle proteine presenti; la concentrazione proteica viene quantificata mediante uno spettrofotometro. Tramite l'utilizzo di un refrattometro si può avere una stima della concentrazione delle proteine, in quanto questo strumento misura la quantità totale di solidi presenti nel liquido in esame. Alcuni fattori propri del campione possono però influenzare la lettura al refrattometro, determinando falsi aumenti: emolisi, lipemia, grave iperglicemia, iperazotemia, ipernatremia, ipercloremia, iperbilirubinemia; ma chiaramente alterazioni modeste non influiscono sulla lettura (Kaneko, 1997; McGrotty e Tennant, 2006). È importante la periodica calibrazione del refrattometro per evitare il rischio di commettere errori. Il refrattometro di Goldberg è uno dei più utili in quanto presenta sia la scala per i solidi totali che quella per il peso specifico dell'urina (Kaneko, 1997).

Le varie frazioni delle proteine sieriche possono essere misurate con diversi metodi biochimici, ma una misurazione più accurata può essere eseguita tramite l'elettroforesi, da sempre esame fondamentale nella diagnosi aspecifica della leishmaniosi canina, così come nel *follow-up* in corso ed al termina della terapia. Il siero od il plasma vengono posti su un gel di acetato di cellulosa (uno dei metodi più utilizzati) in ambiente alcalino ed all'interno di un campo elettrico. Le singole frazioni proteiche, avendo generalmente carica negativa, migrano verso l'anodo (polo positivo) a diversa velocità a seconda delle loro dimensioni e dell'intensità della carica stessa. Successivamente il gel viene chiarificato, colorato e quindi scansionato in un densitometro, che traduce l'intensità della colorazione delle singole frazioni in un tracciato elettroforetico e, solitamente, interpreta le percentuali delle singole frazioni, provvedendo anche a dedurre i valori assoluti, tramite un semplice calcolo interno. Nei soggetti normali il tracciato è formato, ad un'estremità, dal picco alto e stretto dell'albumina e, a seguire, dai picchi delle tre frazioni globuliniche α , β e γ (immunoglobuline)⁷⁴. L'albumina, costituendo la frazione con la maggiore negatività, è quella che migra più velocemente verso l'anodo, mentre le globuline, a negatività inferiore, migrano più lentamente, ed alcune globuline γ non migrano affatto o migrano verso il catodo. Le α e le β sono ulteriormente suddivisibili nelle rispettive sottofrazioni α_1 e α_2 , β_1 e β_2 . Se viene impiegato il plasma invece del siero, le differenze sono quasi irrilevanti, con l'esclusione del picco ampio tra le frazioni β e γ , che può rendere difficoltosa l'interpretazione del tracciato (Kaneko, 1997; McGrotty e Tennant, 2006). Anche con gli strumenti più moderni ed avanzati è sempre necessario che l'operatore abbia ben presenti i picchi delle diverse frazioni della specie in esame (canina, in questo caso) per cercare di addivenire, per quanto possibile, alla standardizzazione delle interpretazioni; un buon punto di partenza può essere l'individuazione della metà del tracciato, che solitamente cade tra i picchi delle α_2 e delle β_1 (Kaneko, 1997).

Tabella 7 - Proteine sieriche: caratteristiche, funzioni e variazioni (separazione su gel di acetato di cellulosa) (Kaneko, 1997).

⁷⁴ Le globuline migrano in gruppi (α , β e γ).

Proteine	PM (D)	Funzione	Variazioni patologiche Aumento (↑), diminuzione (↓)
Prealbumina ⁷⁵	54.400	Trasporto tiroxina	↑ sindrome nefrosica ↓ patologie epatiche, carenze proteiche
Albumina ⁷⁶	69.000	Regolazione pressione osmotica, trasporto	↑ disidratazione ↓ patologie epatiche, renali, gastroenteriche, malnutrizione, perdite di sangue e plasma
Globuline α (α₁ e α₂):			
Globulina legante la tiroxina (TBG)	54.000	Trasporto tiroxina	↑ gravidanza
α ₁ -Fetoproteina	65.000	Sconosciuta	↑ epatomi, gravidanza
α ₁ -Antitripsina	45.000	Inibizione tripsina	↑ patologie infiammatorie acute ↓ patologie epatiche, patologie polmonari croniche
α ₁ -Antichimotripsina	68.000	Inibizione chimotripsina	↑ patologie infiammatorie acute
α ₁ -Glicoproteina acida	44.000	Sconosciuta	↑ patologie infiammatorie acute ↓ patologie epatiche, sindrome nefrosica, malnutrizione
α ₁ -Antitrombina III	65.000	Inibizione trombina	↑ DIC, patologie epatiche
α ₁ -Lipoproteina (HDL, α-lipoproteina)	200.000	Trasporto lipidi	
α ₁ -Lipoproteina (VLDL, pre-β-lipoproteina)	1.000.000	Trasporto lipidi	↑ sindrome nefrosica, diabete mellito, ipotiroidismo, terapia corticosteroidica
α ₂ -Macroglobulina	820.000	Trasporto insulina, inibizione tripsina	↑ sindrome nefrosica, patologie epatiche croniche attive, patologie infiammatorie acute
α ₂ -Globulina	54.000	Trasporto tiroxina	
Ceruloplasmina	151.000	Trasporto rame, ferriossidasi	↑ patologie infiammatorie acute
Aptoglobina	100.000	Trasporto Hgb	↑ patologie infiammatorie acute
Proteina C	62.000	Proteasi, anticoagulante	↑ patologie infiammatorie acute
Globuline β (β₁ e β₂)			
β ₂ -Lipoproteina (LDL, β-lipoproteina)	2.750.000	Trasporto lipidi	↑ sindrome nefrosica, ipotiroidismo, patologie epatocanalicolari
Transferrina	76.000	Trasporto ferro	↑ anemie, carenza di ferro, gravidanza, patologie epatiche acute, sindrome nefrosica
Ferritina	465.000	Trasporto ferro	↑ patologie da accumulo di ferro, patologie infiammatorie acute ↓ carenza di ferro
Emopessina	80.000	Trasporto eme	↓ anemia emolitica, patologie epatiche croniche attive
Frazione C3 del Complemento	75.000		↑ patologie infiammatorie acute, dermatite atopica
Proteina C-Reattiva	140.000	Attivazione Complemento	↑ patologie infiammatorie acute
Frazione C4 del Complemento			↑ patologie infiammatorie acute ↓ patologie autoimmuni
Plasminogeno		Proenzima della plasmina, fibrinolisi	↑ DIC
Fibrinogeno	340.000	Precursore della fibrina, coagulazione	↑ patologie infiammatorie acute ↓ DIC, afibrinogenemia
Globuline γ (γ₁ e γ₂)			

⁷⁵ Non è chiaro se sia visualizzabile nell'elettroforesi del cane: probabilmente appartiene alla frazione α₂.

⁷⁶ Il turnover dell'albumina nel cane (T_{1/2}) è di circa 8 giorni.

Proteine	PM (D)	Funzione	Variazioni patologiche Aumento (↑), diminuzione (↓)
IgG	150.000	Principali anticorpi formati in risposta ad agenti infettivi e tossine	↑ patologie infettive, patologie del tessuto connettivo, patologie epatiche, mielomi ed altre neoplasie del sistema reticoloendoteliale ↓ animali neonati prima dell'assunzione del colostro, patologie da immunodeficienza, agammaglobulinemia
IgA	150.000	Anticorpi secretori nei fluidi degli apparati respiratorio, gastroenterico e genitourinario	↑ e ↓ come sopra
IgE	200.000	Anticorpi nelle allergie	↑ allergie, anafilassi ↓ aglobulinemia
IgM	900.000	Agglutinine fredde, iniziatori	↑ patologie croniche
Catene leggere (proteina di Bence-Jones)	30.000	Parte delle molecole immunoglobuliniche	↑ mieloma

Nella leishmaniosi canina generalmente le proteine totali aumentano in forma evidente, raggiungendo valori superiori a 8 g/dl ed anche fino a 14 (Ciaramella e De Luna, 1999); in alcuni casi però possono essere normali o solo leggermente aumentate, per il fatto che l'incremento delle globuline β e γ è accompagnato, a volte, dalla diminuzione dell'albumina (Bizzeti, 1998). L'iperproteinemia dipende dall'incremento delle globuline, in particolare le β e le γ , che spesso appaiono fuse nel tracciato, dando luogo ad un caratteristico ponte (ponte β - γ , picco policlonale). L'iperglobulinemia è il risultato dell'attivazione eterogenea e policlonale dei linfociti B, con la produzione di ingenti quantità di Ig, per la maggior parte aspecifiche (Bizzeti, 1998; Ciaramella e De Luna, 1999). È stata però segnalata anche una marcata correlazione tra l'aumento del titolo anticorpale (determinato da Ig specifiche), l'aumento delle proteine totali, l'iperglobulinemia e - in proporzione diretta - l'iper- γ -globulinemia; mentre, in senso inverso, il titolo è correlato con l'albuminemia ed il rapporto A/G, come del resto ci si aspetterebbe dalla considerazione dell'appartenenza delle Ig alle frazioni elettroforetiche γ (principalmente) e β (Amusategui *et al.*, 2003). Anche i rilievi di Carrera e coll. (1996) sull'infezione sperimentale⁷⁷, riportano una chiara correlazione tra titolo anticorpale e le alterazioni dell'elettroforetogramma. Questo suggerirebbe che molte delle Ig presenti nel siero dei cani leishmaniotici siano specifiche (Amusategui *et al.*, 2003). Comunque sia, a prescindere dalla specificità delle Ig, si assiste alla formazione di numerosi immunocomplessi circolanti,

⁷⁷ Gli autori riportano che tutti i cani infetti sviluppano un quadro elettroforetico alterato, a partire dal secondo mese post-infezione, per raggiungere le massime alterazioni tra 2,5 e 3 mesi dopo l'infezione.

responsabili, insieme ad altri processi patologici, della complessa e variegata fenomenologia clinica della patologia (Ciaramella e De Luna, 1999). Un'iper- γ -globulinemia con picco monoclonale a banda stretta, tipica delle forme più avanzate e di vecchia data, si ha per l'abnorme sviluppo di un singolo clone anticorpale immaturo (IgG). Questo fatto potrebbe anche avere il significato che esiste un clone maligno e che il processo morboso potrebbe evolvere verso una neoplasia (Bizzeti, 1998). In genere mentre le globuline γ regrediscono abbastanza precocemente in risposta alla terapia, le β persistono più a lungo, in particolare nei casi cronici (Pizzirani e Saponetto, 1989[1]). Oltre all'aumento delle proteine totali e delle globuline, spesso c'è anche la diminuzione dell'albumina e del rapporto A/G, chiara conseguenza delle precedenti alterazioni (Ciaramella *et al.*, 1997). A volte è possibile rilevare anche un elevato picco delle globuline α_2 , che può essere spiegato in due modi diversi in base alla fase della malattia: nella fase iniziale e nelle ricadute, l'aumento delle α_2 spesso esprime l'incremento delle proteine della fase acuta (ceruloplasmina, α_2 -macroglobulina, aptoglobina, proteina C-reattiva)⁷⁸; nelle fasi di cronicizzazione invece tale aumento può essere espressione di un grave danno renale (nefrite o sindrome nefrosica), con l'incremento dell' α_2 -macroglobulina e delle α_2 -lipoproteine (Ciaramella e De Luna, 1999). Secondo Bizzeti (1998) la persistenza dell'iper- α_2 -globulinemia dopo il trattamento, o la ricomparsa in caso di recidive, testimonia l'esistenza di una guarigione clinica particolarmente instabile. Come già detto, spesso si assiste ad una riduzione del picco dell'albumina, che può essere dovuta ad un danno renale (nefropatia proteino-disperdente) e/o ad una ridotta sintesi epatica, causata dal coinvolgimento del fegato, che si verifica soprattutto nelle fasi croniche ed inveterate; conseguentemente il rapporto A/G non solo è diminuito, ma può essere invertito (Ciaramella e De Luna, 1999).

⁷⁸ I livelli di alcune proteine della fase acuta - aptoglobina, proteina C-reattiva e ceruloplasmina - risultano significativamente più alti nei cani positivi rispetto a quelli non infetti; inoltre la concentrazione della proteina C-reattiva è significativamente più alta nei cani sintomatici rispetto a quelli asintomatici. Tali alterazioni, anche se tipiche della leishmaniosi canina, possono verificarsi anche in altri casi: aptoglobina e ceruloplasmina sono aumentate in caso di traumi chirurgici e di poliartriti; la proteina C-reattiva aumenta nella leptospirosi, nella tripanosomiasi, nelle enteriti batteriche ed emorragiche, nella parvovirosi, nell'ehrlichiosi ed in seguito ad interventi chirurgici. Tutte e tre le proteine, inoltre, possono subire incrementi anche durante i trattamenti corticosteroidi (Martínez-Subiela *et al.*, 2002). Proteina C-reattiva ed aptoglobina tendono a normalizzarsi in seguito alla terapia con allopurinolo; inoltre la proteina C-reattiva subisce nuovi incrementi in prossimità di riacutizzazioni della patologia dopo l'interruzione della terapia (Sasanelli *et al.*, 2007).

Nel ribadire l'estrema utilità della sieroelettroforesi come ausilio diagnostico, prognostico e terapeutico, va rimarcato che non si deve correre il rischio di sopravvalutarla o, peggio ancora, di confondere il quadro elettroforetico espresso da altre forme morbose, con quello della leishmaniosi. Si tratta pur sempre di un'indagine altamente aspecifica (id). Secondo Pizzirani e Saponetto (1989[1]) tra i quadri più frequentemente simili, ci sono quelli in corso di piodermite profonda e di piometra.

Di seguito si riporta un sunto schematico delle varie cause di variazione delle frazioni proteiche, gli elettroforetogrammi che possono caratterizzare la leishmaniosi canina e quelli, più o meno simili, propri di altre patologie.

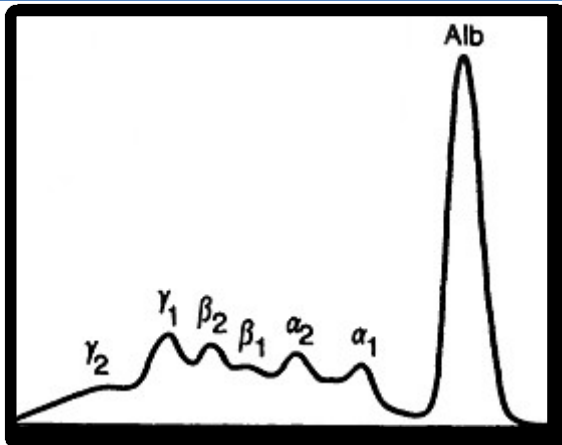
Tabella 8 - Interpretazione delle alterazioni delle frazioni elettroforetiche (Werner e Turnwald, 1999).

FRAZIONE	ALTERAZIONE	CONDIZIONE PATOLOGICA ASSOCIATA
Albumina	↓	Insufficienza epatica, enteropatia proteino-disperdente, grave denutrizione, neoplasia, glomerulopatia proteino-disperdente
α_1	↑	Infezione od infiammazione attiva, malignità; normale nei neonati
	↓	Insufficienza epatica
α_2	↑	Infezione od infiammazione attiva, malignità, patologia epatica, sindrome nefrosica
	↓	Sindrome nefrosica, malignità, insufficienza epatica, anemia emolitica
β_1	↑	Sindrome nefrosica, emolisi, artefatto
	↓	Patologie autoimmuni, lupus eritematoso sistemico, anemia emolitica, abetalipoproteinemia (ereditaria)
β_2	↑	Infiammazione, infezione, mieloma, patologia epatica, enteropatia proteino-disperdente
γ	↑	Infiammazione, infezione cronica o grave, patologia epatica, mieloma
	↓	Immunosoppressione, immunodeficienza, ipogammaglobulinemia; normale nei neonati prima dell'assunzione del colostro, se persiste anche dopo: insufficiente trasferimento passivo di anticorpi del colostro

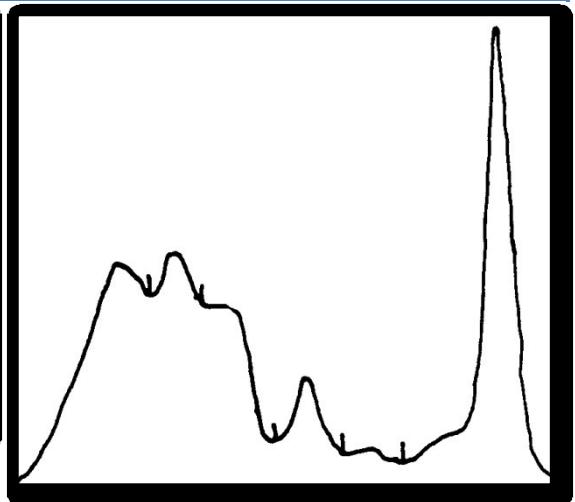
Tabella 9 - Elettroforetogrammi.

Aspetto normale, varie alterazioni in corso di leishmaniosi canina (LeishCan) e quadri di altre patologie.

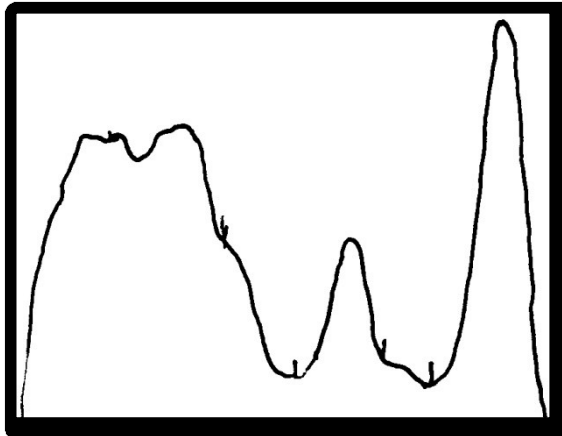
Aspetto normale, varie alterazioni in corso di leishmaniosi canina (LeishCan) e quadri di altre patologie.



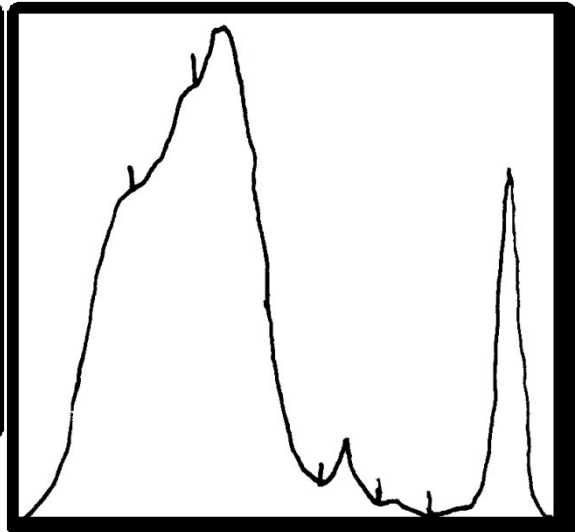
Quadro elettroforetico normale (cane e gatto) (Kaneko, 1997).



LeishCan: aumento policlonale delle globuline β e γ (infezione recente) (Bizzeti, 1998).

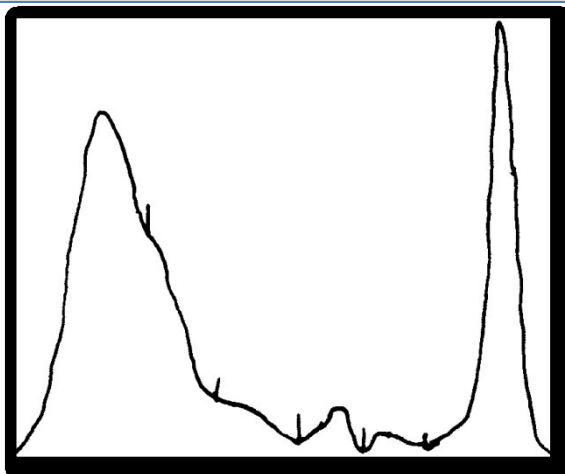


LeishCan: aumento policlonale delle globuline β e γ (aspetto a "pan di zucchero") (id).

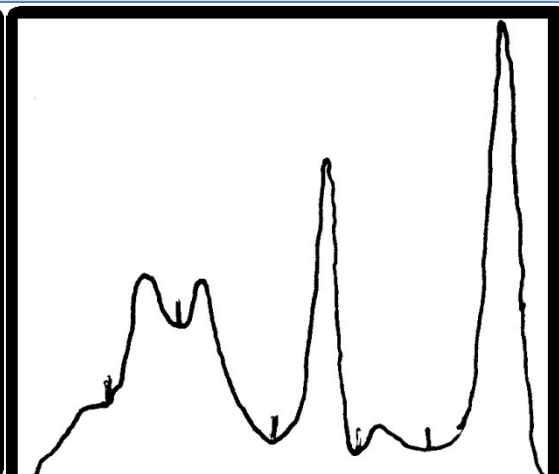


LeishCan: ipoalbuminemia, aumento oligoclonale delle globuline β e γ (infezione di vecchia data) (id).

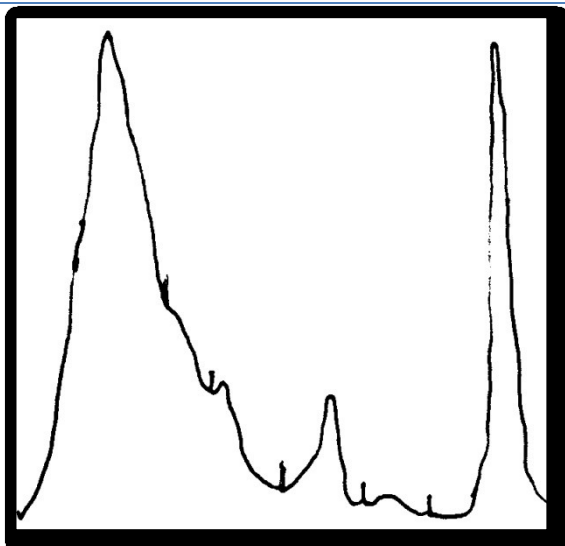
Aspetto normale, varie alterazioni in corso di leishmaniosi canina (LeishCan) e quadri di altre patologie.



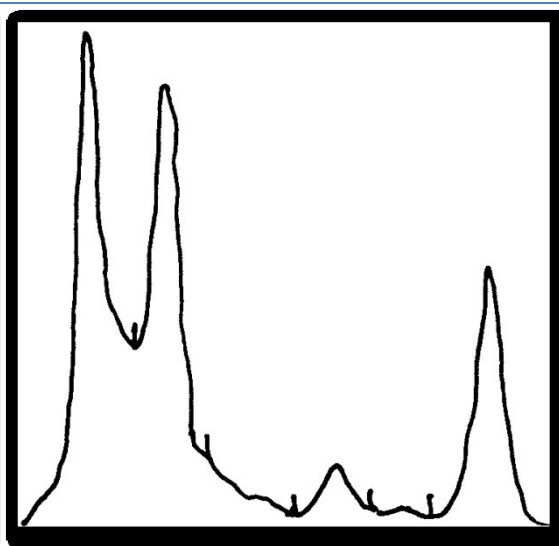
LeishCan: tendenza del picco β - γ oligoclonale a trasformarsi in monoclonale (infezione di vecchia data) (id).



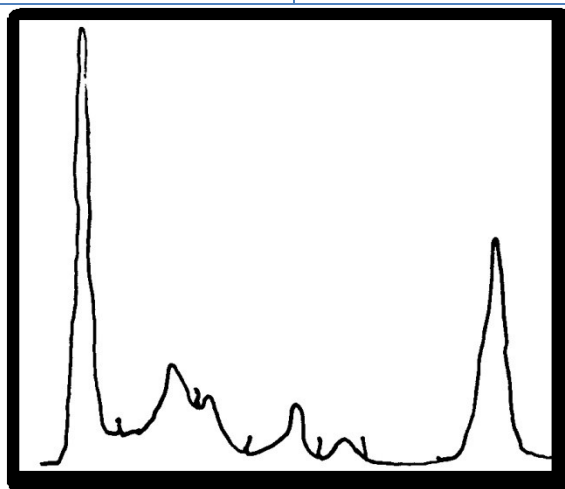
LeishCan: aumento delle globuline α_2 (ricaduta, riacutizzazione) (id).



LeishCan: picco oligoclonale β - γ con un iniziale aumento delle α_2 (infezione di vecchia data con tendenza a riacutizzare) (id).

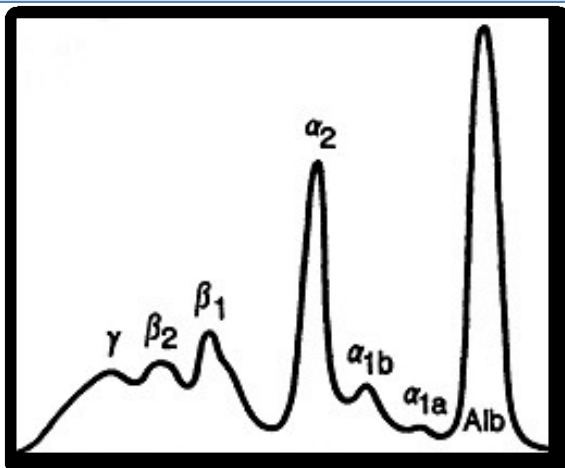


LeishCan: ipoalbuminemia e picco oligoclonale delle β e γ (aspetto "ad orecchie di gatto"; infezione di vecchia data) (id).

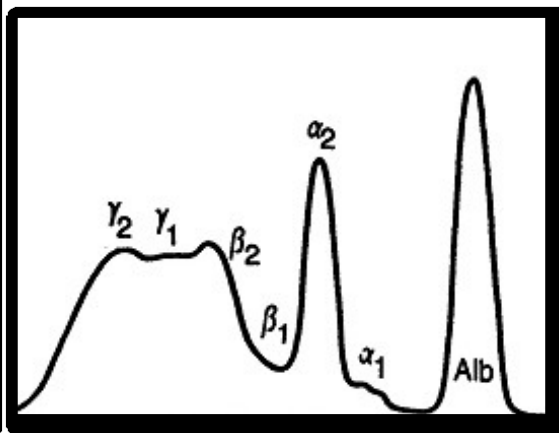


LeishCan: marcata ipoalbuminemia e picco monoclonale delle γ (infezione molto vecchia) (id).

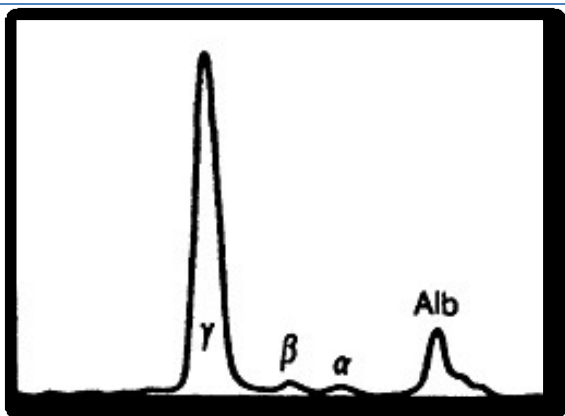
Aspetto normale, varie alterazioni in corso di leishmaniosi canina (LeishCan) e quadri di altre patologie.



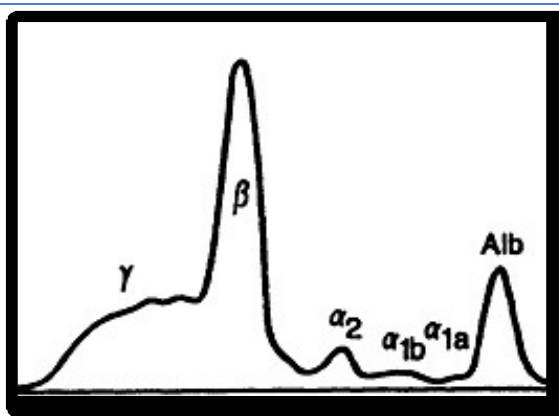
Linfoadenite generalizzata acuta (A/G = 0,48) (Kaneko, 1997).



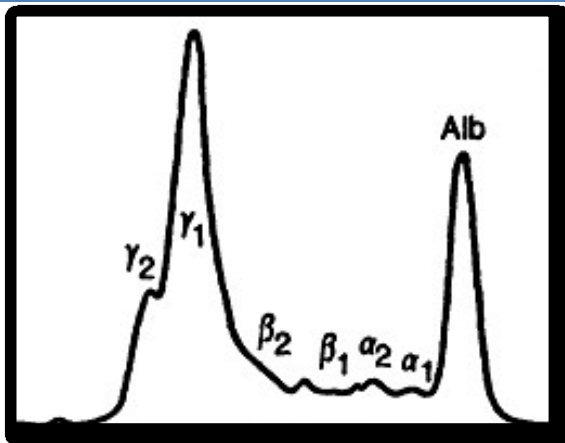
Ascesso da corpo estraneo (A/G = 0,32) (id).



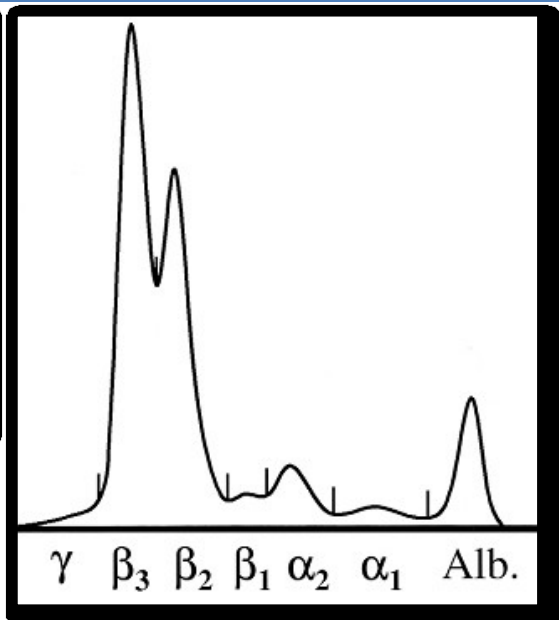
Mieloma multiplo (A/G = 0,23) (id).



Mieloma multiplo (A/G = 0,15) (id).

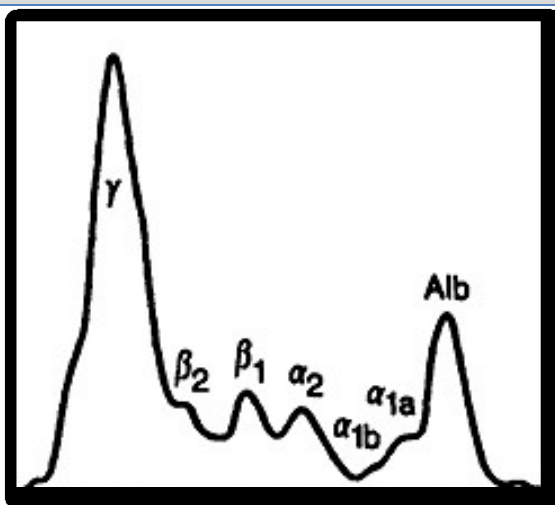


Mieloma multiplo (biclonale; A/G = 0,32) (id).

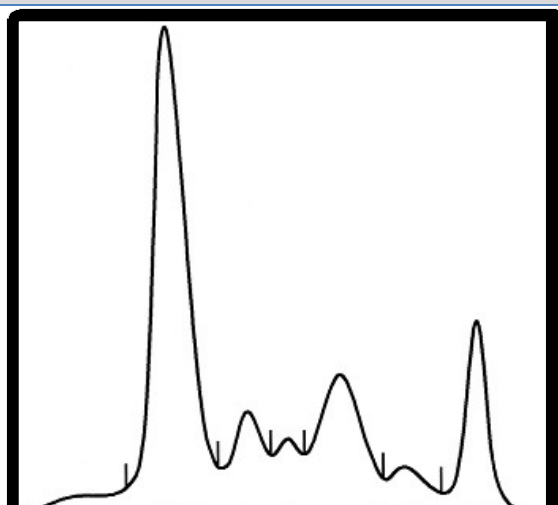


Mieloma multiplo: gammopatia biclonale (PT = 12 g/dl) (Giraudel et al., 2002).

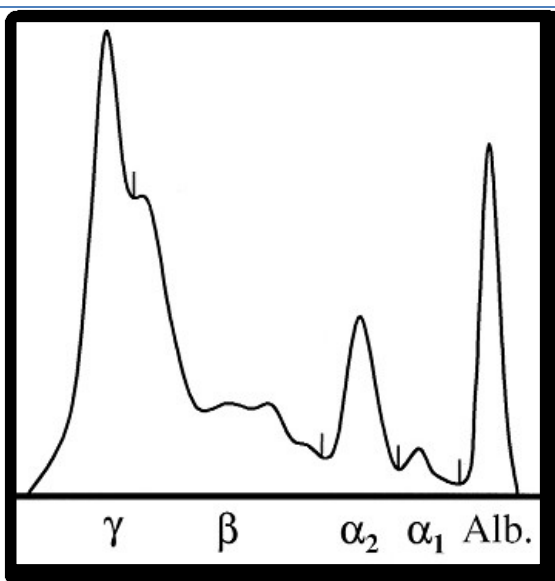
Aspetto normale, varie alterazioni in corso di leishmaniosi canina (LeishCan) e quadri di altre patologie.



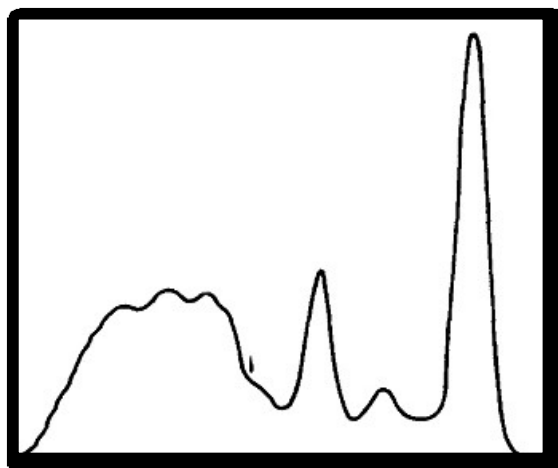
Amiloidosi (A/G = 0,2) (Kaneko, 1997).



Leucemia linfocitica cronica: picco monoclonale delle globuline β (PT = 8,2 g/dl) (Giraudel *et al.*, 2002).



Ehrlichiosi: picco monoclonale che si impone sulla gammopatia policlonale nella regione delle γ (PT = 8,9 g/dl) (id).



Ehrlichiosi in soggetto non pancitopenico: aumento delle globuline α₂, β₂ e γ. Questo tipo di gammopatia è piuttosto tipica di tale forma di ehrlichiosi monocitica canina (Harrus *et al.*, 1996).

3.1.4. Esame delle urine

In considerazione dell'enorme importanza della patologia renale nel quadro clinico e prognostico della leishmaniosi canina, l'esame delle urine andrebbe sempre effettuato. Nei cani leishmaniotici, il principale elemento clinico-diagnostico che si evidenzia all'esame delle urine è la proteinuria, spesso spiccata, solitamente di tipo

misto, espressione di un danno sia glomerulare che tubulare. Danni organici minori sono caratterizzati invece da una proteinuria selettiva, più frequentemente di tipo glomerulare. Talvolta è molto precoce, per cui si può rilevare prima dell'iperazotemia e, in qualche misura, è anche correlata alla gravità del danno renale, in particolare se concorda con altri parametri dell'esame delle urine, come la presenza di cilindri (granulosi o cerei) nel sedimento (Pizzirani e Saponetto, 1989[1]; Ciaramella e De Luna, 1999). La valutazione (semi-)quantitativa della proteinuria può partire dalle semplici **strisce reattive** (*dipstick*), il cui risultato deve essere interpretato alla luce del peso specifico dell'urina: il rilevamento di tracce di proteine non ha solitamente alcun significato clinico se l'urina è concentrata, mentre se è diluita, le stesse tracce rappresentano quantitativi di proteine chiaramente superiori (per es.: tracce di proteine in urine con pS di 1.010, sono superiori alle tracce di proteine in urine con pS di 1.030): quindi valori espressi come tracce o +1 sono normali se il pS è superiore a 1.035, mentre per valori inferiori di pS, qualsiasi presenza di proteine va considerata potenzialmente patologica⁷⁹. Un metodo più accurato, anche se sempre approssimativo, è rappresentato dalla valutazione del rapporto **PU/CU**, che è in buona correlazione con le proteine perse nell'urina nelle 24 ore. Se il risultato è alterato, è necessario eseguire un'analisi completa dello stesso campione per escludere che le modificazioni non siano dovute ad emorragie od infiammazioni. Inoltre il rapporto non informa sull'origine della proteinuria, serve solo a quantificarla (Barsanti *et al.*, 1999). Purtroppo non c'è uniformità interpretativa tra i vari lavori pubblicati; sembra comunque accettabile che valori inferiori a 0,5 siano fisiologici o propri di una proteinuria non significativa; valori tra 0,5 e 0,7 sono di sospetto e necessitano ulteriori approfondimenti; valori superiori a 0,7 indicano una chiara proteinuria (Zini *et al.*, 2007). Barsanti e coll. (1999), più sbrigativamente, riportano che valori superiori ad 1 sono patologici, mentre valori inferiori a 0,3 sono normali, tacendo sul significato dei valori intermedi. Abate e coll. (2005), riferendo sulla bibliografia, riportano i seguenti valori: normalità se il rapporto è inferiore a 0,5, sospetto se è tra 0,5 e 1, anormalità se è superiore a 1. Per valutare il tipo di proteinuria (glomerulare,

⁷⁹ I risultati delle strisce reattive possono essere falsamente aumentati (artefatti) in caso di inumidimento delle strisce stesse durante la conservazione, di contatto troppo prolungato con eccessive quantità d'urina, di urine altamente alcaline (pH \geq 9). Qualsiasi farmaco potenzialmente nefrotossico, può determinare proteinuria; tra i più importanti ricordiamo: antibiotici aminoglicosidici (kanamicina, gentamicina, amikacina, tobramicina); amfotericina B; cisplatino; FANS come aspirina ed ibuprofene (soprattutto se è preesistente una patologia renale o l'ipotensione); polimixina B.

tubulare o mista; selettiva o non selettiva) e quindi anche la sede e l'entità del danno renale, vengono consigliate alcune tecniche elettroforetiche applicate alle proteine urinarie, come l'SDS-AGE⁸⁰ o l'SDS-PAGE⁸¹ (Zini *et al.*, 2007). La loro utilità risiede anche nel possibile monitoraggio della patologia renale. Viene riportato però che queste tecniche hanno dei limiti: l'SDS-AGE si è dimostrata una metodica valida nell'identificazione delle lesioni esclusivamente tubulo-interstiziali, mentre nel riconoscimento delle lesioni miste mostra una carenza di specificità; per quanto riguarda l'identificazione del danno esclusivamente glomerulare, la tecnica ha bassa sensibilità ma elevata specificità. Inoltre con questa metodica è possibile evidenziare la presenza di proteinuria in soggetti non nefropatici, ma affetti da patologie infiammatorie o neoplastiche delle basse vie urinarie, anche se altre analisi ed i segni clinici dovrebbero orientare sulla differenziazione tra queste proteinurie renali e post-renali (Abate *et al.*, 2005). Abbinando l'SDS-PAGE con la tecnica *Western blotting*, sono stati ottenuti notevoli risultati per quanto riguarda l'individuazione del tipo di proteinuria (quasi sempre mista nei cani leishmaniotici proteinurici) e la localizzazione del danno renale (glomerulare e tubulointerstiziale), come confermato dai reperti istologici (Zaragoza *et al.*, 2003).

Oltre alle proteine un altro indice di danno renale facilmente rilevabile è la glicosuria, chiaramente in assenza di iperglicemia a digiuno; in questo caso è probabile una lesione a livello dei tubuli contorti prossimali, dove normalmente avviene il riassorbimento del glucosio dalla preurina. In conseguenza di quanto sopra riportato, l'esame delle urine è fondamentale perché può consentire di evidenziare una patologia renale prima che si verifichi l'iperazotemia (proteinuria, glicosuria con normoglicemia, cilindri, ridotta capacità di concentrare l'urina [urine ipostenuriche, pS basso]) (Barsanti *et al.*, 1999).

3.1.5. Profilo renale

In ogni caso di leishmaniosi sospettata od accertata è opportuna la misurazione dei livelli sierici almeno dei due parametri che sono fondamentali per la funzionalità

⁸⁰ Elettroforesi in gel di agarosio-sodio dodecil solfato.

⁸¹ Elettroforesi in gel di poliacrilamide-sodio dodecil solfato.

renale: creatininemia e BUN⁸². L'aumento di questi parametri, quando si realizza, è però "tardivo", in quanto si verifica allorché il 75% o più dei nefroni è lesionato (o si ha una riduzione superiore al 75% della velocità di **filtrazione glomerulare** (FG) [Barsanti *et al.*, 1999]). Quindi affinché l'iperazotemia - soprattutto l'ipercreatininemia - sia rilevabile, la FG deve subire una contrazione considerevole; successivamente, ulteriori minime diminuzioni della FG, inducono incrementi della creatininemia notevoli, fino ai valori minimi della FG, le cui ulteriori diminuzioni sono accompagnate da aumenti di nuovo ridotti della creatininemia; questo dipende dal fatto che tra creatininemia e FG sussiste una relazione reciproca esponenziale e curvilinea. Comunque si possono avere delle variazioni interindividuali della creatininemia così ampie, che lo stesso valore tra soggetti diversi può corrispondere sia ad una FG normale che diminuita (Braun *et al.*, 2003). Le differenze possono essere dovute a fattori soggettivi, come la stazza, l'età ed il sesso, ma, benché si possa trattare di variazioni statisticamente significative, non lo sono dal punto di vista clinico-diagnostico (Concordet *et al.*, 2008). Allorché la FG è solo leggermente diminuita, il 10-15% della creatinina ematica subisce anche l'escrezione tubulare⁸³ (oltre ad una minima perdita dalla parete intestinale; fenomeni evidenziati nell'uomo, di non chiara importanza nel cane). E non va sottovalutato il fatto che all'inizio dell'insufficienza renale la creatinina è diluita nel suo volume di distribuzione, fenomeno che è più evidente se coesiste una sindrome edematosa (sindrome nefrosica)⁸⁴. Quindi è chiaro che una creatininemia normale non esclude

⁸² I due parametri vengono in genere valutati simultaneamente: l'ipercreatininemia è più indicativa del danno renale rispetto all'aumento della BUN, in quanto quest'ultima risulta più dipendente da fattori extrarenali. Secondo una recente indagine statistica, non c'è differenza significativa tra l'utilità clinico-diagnostica della determinazione dei due parametri e di quella della sola creatininemia (Concordet *et al.*, 2008). Sono segnalate alcune possibili cause di incongruenza tra i valori della creatininemia e della BUN: l'ipercreatininemia insieme con una BUN normale è solitamente dovuta ad un errore laboratoristico (Arneson e Brickell, 2007), meno frequentemente si può avere in caso di miosite/trauma muscolare, dieta a base di carne cotta (aumento moderato e transitorio della creatininemia) e di chetonemia (creatininemia falsamente aumentata); l'ipercreatininemia con BUN diminuita si può avere in caso di insufficienza epatica, poliuria-polidipsia e dieta povera di proteine; l'aumento della BUN con creatininemia normale si può avere in caso di dieta ad alto contenuto proteico, emorragia gastrointestinale, somministrazione di tetracicline o di corticosteroidi e febbre; una BUN aumentata con un'ipocreatininemia si può avere, molto raramente, in caso di notevole diminuzione della massa muscolare (grave cachessia) (Barsanti *et al.*, 1999).

⁸³ Tubuli contorti prossimali: soprattutto nel maschio, ma l'importanza di questo fenomeno appare trascurabile, anche nell'insufficienza renale cronica (Braun *et al.*, 2003).

⁸⁴ In presenza di una sindrome edematosa la creatininemia appare più bassa del valore reale; per correggere il valore rilevato, nell'uomo può essere applicata la seguente formula: Cr corretta = Cr misurata x [1 + (differenza di peso / 60% del peso del corpo)] (Desport e Robert, 2007). Si segnala

l'insufficienza renale, mentre l'ipercreatininemia rappresenta un marcatore molto specifico dell'alterata funzionalità organica⁸⁵ (Desport e Robert, 2007), soprattutto per quanto riguarda l'**insufficienza renale cronica** (IRC: monitoraggio della progressione e della risposta al trattamento). In questo senso, l'efficienza della BUN è inferiore, in quanto molto più variabile in relazione a cause extrarenali (soprattutto l'apporto alimentare). È stato calcolato che la specificità della creatininemia nella diagnosi dell'IRC (intervallo di riferimento $1,4 \pm 0,3$ mg/dl [124 ± 28 μ mol/l]), va dal 46% per valori compresi tra 1,24 e 1,47 mg/dl (110-130 μ mol/l), per passare al 60% per valori compresi tra 1,47 ed 1,7 mg/dl (130-150 μ mol/l), all'89% per valori compresi tra 1,7 e 1,92 mg/dl (150-170 μ mol/l) ed al 97% per valori superiori. In letteratura vengono riportati intervalli di riferimento per la creatininemia estremamente variabili (da 0,39 a 2,82 mg/dl), spesso senza indicare le caratteristiche della popolazione da cui sono ottenuti né il metodo analitico utilizzato (la classica reazione di Jaffé può sovrastimare la creatinina plasmatica fino al 45%; più attendibili appaiono i metodi enzimatici). È quindi importante non basarsi sui dati della letteratura, ma stabilirne di interni al laboratorio o comunque a partire dal metodo analitico utilizzato (Braun *et al.*, 2003). Anche perché i risultati possono essere molto diversi tra laboratori differenti, quindi non solo in base al metodo analitico, come evidenziato in una ricerca recente sull'analisi di due stessi campioni eseguita in varie cliniche; questo dipende più da manualità divergenti che da ragioni tecniche oggettive, in quanto i valori discordanti si registrano anche quando vengono utilizzate le stesse identiche strumentazioni (Braun *et al.*, 2008).

Quando l'azotemia non tende ad abbassarsi, nonostante la terapia specifica e di supporto, la prognosi è chiaramente infausta (Pizzirani e Saponetto, 1989[1]; Ciaramella e De Luna, 1999). Vengono però riportati casi non rarissimi di recupero di soggetti con BUN anche superiore a 300 mg/dl e creatininemia superiore a 4 mg/dl, che hanno risposto a trattamenti di AnM a dosaggio dimezzato in abbondante soluzione endovenosa e con l'aggiunta di prednisone (1-4 mg/kg). Sarebbe utile

inoltre che la creatininemia aumenta in caso di disidratazione, ma solo se questa è più alta del 5%; non c'è comunque proporzionalità tra i due parametri e sussiste un'ampia variabilità individuale (Braun *et al.*, 2003).

⁸⁵ Alcune cause extrarenali possono indurre diminuzioni moderate della creatininemia: denutrizione, patologie epatiche, età avanzata, iperbilirubinemia, dieta molto povera in proteine.

associare ai due parametri suddetti anche la misurazione sierica del fosforo⁸⁶, del colesterolo⁸⁷ e del calcio, in quanto tali valori possono essere variamente modificati in diverse fasi della patologia renale (Pizzirani e Saponetto, 1989[1]). L'iperazotemia che può essere osservata in corso di leishmaniosi è chiaramente di origine renale; questo tipo di localizzazione patogenetica è possibile, almeno approssimativamente, già solo con i valori dell'iperazotemia stessa (BUN e creatininemia) e del pS dell'urina: iperazotemia + pS urina compreso tra 1.008 e 1.030 (benché soggetti in insufficienza renale possano avere anche un pS urinario di 1.006-1.007). Tali rilievi si possono verificare però anche in altre situazioni, estranee all'insufficienza renale, acuta o cronica che sia, in cui prevalga la componente della disidratazione associata alla diminuzione della capacità di concentrare le urine: setticemia da *E. coli*, piometra, ascesso prostatico; pielonefrite; ipoadrenocorticismo; ipercalcemia, iponatremia, ipokalemia; diabete mellito chetoacidotico od iperosmolare; iperadrenocorticismo con disidratazione; diabete insipido con disidratazione; insufficienza epatica; ostruzione o rottura del tratto urinario; trattamento di qualsiasi causa prerenale di azotemia con fluidi o diuretici (Barsanti *et al.*, 1999). Com'è stato notato, l'iperazotemia è un marcatore tardivo dell'insufficienza renale, benché possa essere utile nel monitoraggio della stessa. Il metodo di prima scelta per evidenziare una patologia renale a livello clinico, dovrebbe essere la misurazione della velocità di filtrazione glomerulare (GFR), che purtroppo richiede un impegno tecnico e temporale non indifferente; appare comunque percorribile il test della *clearance* della creatinina plasmatica esogena (PECCT), che consiste nell'inoculazione IV di creatinina esogena, seguita da misurazioni seriali della creatininemia nel tempo (per es.: a 0, 5, 10, 60, 120, 240, 360 e 480 minuti). È importante disporre di un intervallo di riferimento appropriato per il metodo di misurazione della GFR utilizzato: il *range* dovrebbe essere calcolato a partire da una popolazione molto ampia, in modo da minimizzare le variazioni individuali, in particolare per quanto riguarda la stazza dei cani (soggetti di taglia piccola hanno normalmente una GFR più alta di quelli di taglia grande, che infatti

⁸⁶ La fosforemia può essere aumentata nei pazienti con ridotta velocità di filtrazione glomerulare, soprattutto nei casi d'insufficienza renale acuta. Nei soggetti con insufficienza renale cronica, il controllo dei livelli del fosforo è importante per cercare di combattere la mineralizzazione renale, secondaria all'iperparatiroidismo (iperparatiroidismo renale secondario) (Barsanti *et al.*, 1999).

⁸⁷ L'ipercolesterolemia, spesso associata alla sindrome nefrosica, consegue all'eccessiva perdita urinaria delle proteine di trasporto, per cui il colesterolo si accumula nel sangue (Arneson e Brickell, 2007).

manifestano una creatininemia leggermente più elevata⁸⁸). Al momento non sono però disponibili dati attendibili che permettano di mettere in relazione i valori della GFR con lo stato di sofferenza renale in soggetti leishmaniotici; infatti, anche se negli stadi precoci dell'IRC di solito si assiste ad una significativa diminuzione della GFR, in alcuni soggetti proteinurici non iperazotemici essa è aumentata (iperfiltrazione). Questo può essere dovuto al fatto che le lesioni renali non sono ancora così gravi da alterare la funzionalità organica, oppure i valori aumentati della GFR appartengono ad una fase più avanzata che sta per evolvere in senso opposto (diminuzione della GFR) (Cortadellas *et al.*, 2008).

3.1.6. Profilo epatico

Anche se il fegato può essere interessato dall'invasione da parte di *Leishmania*, soprattutto perché costituito ampiamente dalle cellule del sistema reticolo-istiocitario, l'importanza dei parametri sierici indice di danno epatocellulare od epatoduttale, è inferiore a quella dei parametri della funzionalità renale. Pizzirani e Saponetto (1989[1]) riportano che il 15% dei cani leishmaniotici presenta livelli di ALT⁸⁹ aumentati, ed il 23% quelli dell'ALP. Secondo quanto riportato da Ciaramella e coll. (1997) il 16% dei soggetti affetti presenta un aumento moderato di ALT, ALP e γ GT; che è la stessa percentuale in cui gli Autori hanno rilevato iperazotemia. Amusatogui e coll. (2003) hanno riportato che i soggetti affetti dalla forma più avanzata (grave) della malattia, sono quelli che presentano i valori più alti di ALT, BUN e creatininemia.

3.1.7. Altre alterazioni di laboratorio

Nei cani leishmaniotici viene riportato un possibile aumento dei lipidi totali, del colesterolo e dei trigliceridi. Inoltre la frazione di colesterolo legata alle LDL risulta aumentata, mentre il contrario avviene con la frazione legata alle HDL. Queste alterazioni sono state messe in relazione con il coinvolgimento epatico in corso di leishmaniosi, ma è stato ipotizzato anche un intervento diretto del parassita nel metabolismo lipidico, in considerazione della composizione lipidica della parete di *Leishmania* (LPG) (Nieto *et al.*, 1992).

⁸⁸ Bisognerebbe tenere presente questo aspetto nella valutazione di valori di creatininemia *borderline* (come 1,5-1,6 mg/dl) in cani di taglia medio-grande.

⁸⁹ In generale i livelli sierici dell'ALT non sono correlati alla gravità della patologia epatica sottostante (Willard e Twedt, 1999).

È stato rilevato che i cani leishmaniotici hanno livelli plasmatici di trombomodulina (glicoproteina di membrana dell'endotelio vasale, che ha affinità con la trombina) significativamente superiori ai soggetti sani, in correlazione anche alla gravità della forma clinica; tale parametro potrebbe avere importanza come *marker* non invasivo per rilevare un danno endoteliale in fase precoce, prima che i relativi segni clinici siano evidenti (Ciaramella *et al.*, 2004).

3.2. Esami specifici

3.2.1. Sierologia

Gli esami sierologici sono metodi indiretti che evidenziano la presenza del parassita tramite la rilevazione degli anticorpi specifici. In relazione ai metodi diretti parassitologici, offrono il vantaggio della sensibilità superiore e della maggiore praticità soprattutto nel caso di *screening* di massa. Per la diagnosi sierologica della leishmaniosi canina ci sono in commercio diversi kit che si basano su test immunologici caratterizzati da svantaggi e vantaggi. In linea generale il test sierologico ideale dovrebbe essere contraddistinto da: elevata specificità e sensibilità (non esiste un test caratterizzato da sensibilità e specificità del 100%, per cui è importante selezionare bene il kit da utilizzare anche in funzione della prevalenza dell'infezione nell'area in cui si opera); economicità; rapidità di esecuzione; facilità di lettura; ripetibilità dei risultati (tra i diversi lotti) (Mancianti, 2001).

Probabilmente l'interpretazione dei risultati dei test sierologici è ancora più importante della scelta del test stesso. In questo senso sono fondamentali due considerazioni:

- La positività sierologica ad un test attendibile può non corrispondere a malattia in atto; indica soltanto un'infezione, non, necessariamente, la relativa malattia (infettiva);
- Solo una parte degli animali punti da vettori infetti vengono infettati in modo persistente.

Infatti risulta che circa il 14% degli animali sierologicamente positivi dopo una stagione di trasmissione, si negativizzano dopo la stagione successiva. Ciò porterebbe

ad ipotizzare che: sono necessari diversi contatti tra il parassita e l'ospite affinché si stabilisca un'infezione persistente; i parassiti possono essere eliminati dall'ospite in virtù del suo sistema immunitario; i parassiti si localizzano in qualche sede da cui non stimolano la produzione di anticorpi rilevabili. Per questi motivi, nelle indagini di *screening*, le rilevazioni sierologiche iniziano a gennaio e terminano a maggio, prima dell'inizio della stagione di trasmissione (id).

La sieroconversione si realizza mediamente entro 5 mesi (1-22) dall'infezione in condizioni naturali e 3 mesi (1-6) in condizioni sperimentali (Paltrinieri *et al.*, 2007). È chiaro quindi che un test sierologico effettuato quando l'infezione è avvenuta ma non si è ancora verificata la sieroconversione, sarà negativo (falso negativo). Del resto gli anticorpi possono essere rilevabili anche nei casi in cui nessun altro test diretto (esame parassitologico, PCR) risulta positivo, e quindi, in assenza di sintomi, può trattarsi di casi non infetti attualmente (Lachaud *et al.*, 2002; Maia *et al.*, 2007). In senso generale dunque, la sensibilità di qualsiasi tecnica diagnostica cambia nel corso dell'infezione ed anche tra i diversi soggetti (in relazione alla capacità individuale di resistere al parassita oppure no); in questo senso la sierologia, che richiede un'attenta valutazione del valore soglia, può essere altamente sensibile durante la maggior parte dell'infezione, mentre la PCR, che risulta maggiormente sensibile nelle fasi recenti, offre il vantaggio dell'elevata specificità (Quinnell *et al.*, 2001[2]).

Solo alcune delle tecniche diagnostiche sierologiche approntate nel corso del tempo vengono utilizzate attualmente - IFAT, ELISA e kit ambulatoriali di immunomigrazione - altre, come la fissazione del complemento, il test all'inchiostro di china e la controimmunolettroforesi, hanno valore più storico che pratico, anche se a volte vengono eseguite come conferma di casi "difficili" (Mancianti, 2001; Paltrinieri *et al.*, 2007).

3.2.1.1. Emoagglutinazione indiretta (IHAT)

Ha rappresentato il primo kit messo in commercio per la diagnosi sierologica di leishmaniosi umana. Il risultato può essere letto entro poche ore. Il test si basa sulla capacità agglutinante dei sieri positivi nei confronti di eritrociti a cui sono stati adsorbiti antigeni di *L. donovani*. Sostanzialmente è una metodica di facile esecuzione

ma nel cane ha scarsa sensibilità (66% circa), soprattutto per il fenomeno di “prozona”⁹⁰ che può essere svelato mediante più diluizioni di *screening*, per non correre il rischio di false negatività, ma questo aumenta il costo del metodo. Il titolo soglia per lo *screening* è di 1/16, ma spesso la prozona si manifesta fino a 1/512, per cui l’IHAT risulta piuttosto scomoda, oltre che, come detto, troppo costosa (Mancianti e Meciani, 1988; Pizzirani *et al.*, 1989; Mancianti, 2001).

3.2.1.2. *Agglutinazione diretta (DAT)*

Inizialmente sviluppato per la diagnosi di leishmaniosi viscerale umana ed applicato nel 1986 a quella canina tramite metodica “al latex”, è risultato non troppo sensibile (84%), fornendo anche dei risultati di specificità piuttosto deludenti, tali da sconsigliarne l’utilizzo pratico: sono stati rilevate alte percentuali di false positività in presenza di sieri di cani affetti da altre patologie, come dermatiti aspecifiche, rogne, filariosi occulta, leptospirosi, borreliosi e toxoplasmosi (tesi Pedonese, 1994; Mancianti, 2001). In un’area endemica del Brasile (*L. chagasi*) è stata comparata la specificità del DAT e dell’IFAT in relazione alla triade diagnostica osservazione microscopica-coltura-PCR: il DAT si è rivelato più specifico dell’IFAT (91% vs 74%), mentre le sensibilità dei due metodi sono risultate ottime e sovrapponibili (100%) (da Silva *et al.*, 2006⁹¹).

3.2.1.3. *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

L’ELISA fa parte dei test immunoenzimatici che si basano sull’impiego di un estratto proteico crudo di parassiti in coltura come antigene specifico: l’antigene crudo, essendo costituito dall’insieme di tutti gli antigeni proteici del parassita, ha il pregio di poter essere prodotto facilmente ed in elevate quantità, ma conferisce un’affidabilità relativamente scarsa al test immunoenzimatico, a causa delle possibili risposte aspecifiche (Ciaramella e De Luna, 1999). Inoltre i risultati forniti tramite l’uso di antigeni totali non sono facilmente leggibili con uno spettrofotometro (in alcuni casi le densità ottiche dei controlli sono superiori al minimo definito dalla casa

⁹⁰ Quando è presente un eccesso di antigene, non si verifica la normale reazione di agglutinazione, in quanto il reticolo tra antigeni ed anticorpi, responsabile dell’agglutinazione stessa, si forma solo al raggiungimento di un rapporto ottimale fra le due componenti.

⁹¹ In base a questi risultati, gli autori consigliano di utilizzare il DAT al posto dell’IFAT nelle indagini sierologiche di massa, almeno nella zona oggetto dello studio (area di Belo Horizonte, stato di Minas Gerais).

produttrice del kit), per cui si adattano solo ad una lettura non strumentale ovvero non obiettiva; inoltre, un tale tipo di lettura diretta, presenta discordanze molto marcate con i test di riferimento (Mancianti, 2001). Del resto, in generale nelle indagini sierologiche, l'utilizzo di antigeni totali permette di rilevare agevolmente titoli anticorpali elevati, ma in presenza di titoli bassi o *borderline*, propri, per esempio, delle fasi latenti o asintomatiche dell'infezione, mostra evidenti carenze (Talmi-Frank *et al.*, 2006). Dal punto di vista metodologico il test si effettua ponendo il siero in esame a contatto con l'antigene, adsorbito sul fondo dei pozzetti di piastre per esami immunoenzimatici. Dopo incubazione a 37 °C per 30 minuti ed eliminazione dell'eccesso di antigene, viene aggiunta l'antiglobulina di cane coniugata con perossidasi o con altro enzima analogo. La reazione colorimetrica che si sviluppa, facendo reagire l'enzima con il suo substrato, dopo accurati lavaggi, può essere quantificata mediante lettura spettrofotometrica (Ciaramella e De Luna, 1999).

Nell'intento di ottimizzare la metodica, l'antigene crudo è stato sostituito da altri tipi di antigeni. Uno di questi è l'antigene ricombinante K39 (rK39); questo, formato da 39 aminoacidi, è stato isolato da amastigoti di *L. chagasi* e prodotto per clonazione del genoma corrispondente a proteine della superfamiglia delle kinesine. In uno studio del 1997 questo antigene si è dimostrato interessante per le sue elevate specificità (98,8%) e sensibilità (97,1%) (Ciaramella e De Luna, 1999). In saggi sul campo però l'ELISA basata su quest'antigene si è dimostrata poco sensibile in animali infettati recentemente e già sottoposti a terapia. I test immunoenzimatici che si avvicinano di più al test ideale, dovrebbero essere di facile interpretazione e, fornendo i risultati in termini di densità ottica, evitano la perdita di tempo necessario per la titolazione. Ma il fatto che *Leishmania* è organismo eucariote e quindi con un enorme numero di determinanti antigenici, rende difficile l'identificazione di frazioni specifiche e costanti: esse infatti esprimono in genere diversa immunogenicità e sono variamente rappresentate nei diversi soggetti anche in dipendenza della fase della malattia (Mancianti, 2001). Recentemente è stato descritto un nuovo metodo⁹² che si basa sull'ELISA e che impiega una proteina ricombinante ottenuta dall'unione dei principali determinanti antigenici di amastigoti di *L. infantum*: in comparazione con l'IFAT (riferimento), escludendo i titoli dubbi di 1/40, il metodo ha mostrato una

⁹² Leishmacheck RP® (Agrolabo™).

sensibilità del 93,9%, una specificità del 97% ed una concordanza del 95.5%, mentre i risultati di un altro kit commerciale⁹³ sono risultati rispettivamente: 94,9, 78,2 ed 86,5 (Boarino *et al.*, 2008).

La tecnica dot-ELISA è una modificazione dell'ELISA classica; essa impiega promastigoti interi fissati su un supporto di nitrocellulosa e posti sul fondo di micropiastre; la reazione si svolge come nella metodica classica, ma non è richiesto lo spettrofotometro. Per questo motivo presenta dei vantaggi tecnici, come il fatto di poter essere utilizzata anche con sieri lipemici ed emolitici, inoltre è più rapida (1,5-2 ore), anche se richiede quantità di antigene quattro volte superiori rispetto all'ELISA. Disponendo di antigene su nitrocellulosa, il test può essere eseguito direttamente sul campo, compreso l'ambulatorio (Pizzirani *et al.*, 1989). Comparando i risultati del dot-ELISA con quelli dell'IFAT preso come riferimento, sono stati ottenuti valori di sensibilità e specificità del 93,1% e dell'86% rispettivamente; in particolare il dot-ELISA è risultato affidabile per titoli elevati a partire da 1/320, mentre a titoli inferiori i falsi negativi sono stati numerosi, cosa che, comunque, confermerebbe la vocazione del test, che è nato per l'utilizzo sul campo (tesi Pedonese, 1994). Secondo Fisa e coll. (1997) il dot-ELISA presenta indubbi vantaggi pratici rispetto all'ELISA tradizionale ed all'IFAT: facilità e rapidità di esecuzione, semplicità dei materiali, compreso un numero minimo di reagenti, non richiede né uno spettrofotometro (come nel caso dell'ELISA) né un microscopio a fluorescenza (come nel caso dell'IFAT). Gli Autori hanno applicato il test in uno *screening* in Spagna, comparandolo con l'IFAT: la maggior parte dei sieri testati raggiunge il limite di positività (*cutoff*) di 1/80 per l'IFAT e di 1/800 per il dot-ELISA; i due test sono risultati significativamente associati con un'alta concordanza della sieropositività: 96% con *cutoff* a 1/400 e 94% con *cutoff* a 1/800; il calcolo della sensibilità e della specificità del dot-ELISA è stato effettuato in relazione ai casi con conferma parassitologica: 100% per entrambe con *cutoff* a 1/400, mentre con *cutoff* a 1/800 la sensibilità è risultata del 90% e la specificità del 100%; il dot-ELISA è risultato però positivo anche in soggetti che avevano altre malattie infettive (false positività): in 4 su 37 con titoli > 1/800 ed in 6 su 37 con titoli tra 1/100 ed 1/400. Secondo quanto riportato da Ferrer e coll. (1995) il

⁹³ Leishmania-96® (Agrolabo™; metodica ELISA classica).

dot-ELISA, pur essendo un buon metodo diagnostico in senso assoluto, ha una scarsa utilità nel *follow-up* in corso di malattia e di terapia.

3.2.1.4. *Immunofluorescenza indiretta (IFAT)*

L'IFAT è ancora il test sierologico più utilizzato rappresentando il *golden standard* per la diagnosi di leishmaniosi secondo l'OMS (Ferroglia e Vitale, 2006), anche se presenta dei limiti: soggettività di lettura⁹⁴, variabilità dell'antigene fissato su vetrini, scarsa affidabilità per titoli bassi (false positività e negatività) (Ciaramella e De Luna, 1999); richiede un microscopio a fluorescenza ed i reagenti presenti in commercio possono rivelarsi meno affidabili di quelli "fatti in casa" (Mancianti, 2001). Inoltre sarebbe più affidabile nel rilevare soggetti che si trovano nelle fasi avanzate dell'infezione (Boarino *et al.*, 2008); al contrario, secondo Mancianti (2001), uno dei maggiori vantaggi risulta proprio la precocità di rilevazione della sieroconversione: l'andamento altalenante del titolo anticorpale, proprio delle prime fasi dell'infezione, è stato riconosciuto proprio con l'IFAT. Il test si esegue facendo reagire il siero del soggetto in esame, opportunamente diluito per raddoppio in base 10, con l'antigene di *Leishmania* fissato su vetrini, a 37 °C per 30 minuti circa. Dopo un lavaggio, si aggiunge l'antiglobulina specifica coniugata con isotiocianato di fluorescina, a cui segue un'incubazione a 37 °C, altri lavaggi ed il montaggio su vetrini con glicerina. La lettura dei campioni viene effettuata al microscopio a fluorescenza (Pizzirani *et al.*, 1989, Ciaramella e De Luna, 1999). L'IFAT ha una specificità del 100%, per titoli superiori ad 1/160, ed una sensibilità molto soddisfacente, essendo compresa tra il 98,4% ed il 99,5% (Mancianti, 2001), anche se tali valori diminuiscono su campioni con titoli *borderline* (1/40 - 1/80): si tratta della cosiddetta "zona grigia", che rappresenta un problema frequente per molti laboratori che riportano valori di *cutoff* tra 1/20 e 1/160 (Boarino *et al.*, 2008). È stato riportato che l'utilizzo di una metodica IFAT basata su amastigoti invece che su promastigoti (che in genere fungono da antigeni del test), dà risultati ancora migliori in termini di sensibilità e come precocità di rilevazione della sieroconversione (Fernández-Pérez *et al.*, 1999).

⁹⁴ L'IFAT dovrebbe essere effettuato sempre presso lo stesso laboratorio e, nei casi dubbi, solitamente di fronte a titoli bassi, è consigliabile la ripetizione magari a distanza di 20-30 giorni (Bizzeti *et al.*, 1989).

I soggetti asintomatici - che rappresentano la classe di pazienti più difficile da gestire - con titolo anticorpale basso (1/80 - 1/160) dovrebbero essere considerati infetti e quindi sottoposti a monitoraggio sierologico bimestrale, per evidenziare eventuali variazioni del titolo stesso o delle proteine sieriche. Può accadere che alcuni soggetti asintomatici presentino un titolo “altalenante”, che varia da basso a positivo a negativo: questi cani vanno esaminati più di due volte per accertare che il titolo sia scomparso effettivamente. Ci possono essere anche casi di soggetti chiaramente sintomatici ma sierologicamente negativi: l’IFAT ha una sensibilità molto alta (fino al 99%), ma esiste sempre la possibilità che un’esigua percentuale di cani infetti non venga rilevata. Questo può avvenire nelle primissime fasi dell’infezione, nei casi in cui la risposta immunitaria del soggetto è diretta verso altri determinanti antigenici, per immunosoppressione indotta dal parassita o di origine iatrogena (terapia cortisonica), o nei rari casi di immunodeficienza congenita con deficit dello *switching* isotipico (incapacità di passare da IgM a IgG, IgA ed IgE). In conclusione si può dire che:

- Un titolo sierologico $\geq 1/160$ indica sempre infezione in atto;
- Titoli compresi tra 40 ed 80, in assenza di sintomi, devono essere considerati dubbi;
- Si può avere malattia anche con sierologia negativa (Mancianti, 2001).

In caso di sierologia positiva in soggetti asintomatici, si tratta di animali che verosimilmente sono entrati in contatto col parassita, hanno prodotto gli anticorpi e possono evolvere sia verso la guarigione spontanea, sia verso la malattia; può trattarsi quindi di uno stato passeggero del quale non si può prevedere l’evoluzione. Potrebbe anche trattarsi di forme particolari latenti che prima o poi svilupperanno la patologia. A fianco delle possibili ipotesi per spiegare l’assenza di anticorpi rilevabili con le tecniche sierologiche classiche, si può proporre la predominanza di un’immunità cellulomediata efficace, l’azione delle cellule NK o l’esistenza di ceppi parassitari epidermotropi che, per la loro localizzazione cutanea, non stimolerebbero efficacemente la produzione anticorpale (Lamothe, 2002).

ASSOCIAZIONE TRA SIEROLOGIA, FORMA CLINICA E MONITORAGGIO TERAPEUTICO

Secondo Ciaramella e De Luna (1999) e Ferroglio e Vitale (2006) non c'è una proporzionalità diretta tra titolo anticorpale e gravità della malattia; per cui la valutazione delle variazioni del titolo sierologico nel monitoraggio della terapia è di scarso significato; più utile sarebbe l'eventuale negativizzazione al termine dei diversi cicli terapeutici, o la ricomparsa di sieroconversione, indice precoce di ricaduta. Secondo Mancianti (2001) l'IFAT è una delle poche metodiche, se non l'unica metodica sierologica, che, insieme ad altre analisi ed alla variazione dei segni clinici, permette il monitoraggio in corso di terapia, anche se spesso il titolo non cambia sostanzialmente nel passaggio dalla forma asintomatica a quella sintomatica e viceversa (Mancianti e Franceschi, 2006). Analogamente anche Paltrinieri e coll. (2007) affermano che il titolo anticorpale può essere utile nell'identificazione dei soggetti con disseminazione del parassita e nel monitoraggio della risposta terapeutica. Amusategui e coll. (2003) hanno rilevato una chiara correlazione solo tra la positività all'IFAT e la presenza dei segni clinici, senza una relazione tra valori del titolo e gravità della malattia, come del resto parecchi altri studi. Invece Giauffret e coll. (1976) osservarono i titoli più alti nei soggetti con le forme viscerali più gravi, rispetto a quelli con forme cutanee di gravità moderata ed una progressione più lenta della patologia. Bourdoiseau e coll. (1997[3]) rilevarono che titoli $\leq 1/640$ erano significativamente associati ad infezione asintomatica, mentre titoli $> 1/640$ erano associati ad infezione sintomatica, senza distinzione tra livelli di gravità. Al contrario, Moreira e coll. (2007) hanno riscontrato una risposta umorale (ELISA) d'intensità decrescente nei soggetti asintomatici, sintomatici ed oligosintomatici, ipotizzando una qualche forma di soppressione dell'immunità umorale nei cani sintomatici⁹⁵. Applicando l'ELISA alla rilevazione di diversi isotipi anticorpali (IgG, IgM ed IgA), è stato rilevato che i soggetti sintomatici hanno, rispetto agli asintomatici, livelli di ciascun isotipo significativamente superiori (Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007). Nelle coinfezioni umane leishmaniosi viscerale-AIDS è stato riportato che la sierologia classica (IFAT ed ELISA con rK39) ha scarsa utilità nel monitoraggio della terapia e

⁹⁵ Lo studio ha riguardato la comparazione di diverse tecniche diagnostiche in relazione alla forma clinica della malattia. La sensibilità sulle biopsie linfonodali poplitee, è stata, per la citologia, del 75,61% nei sintomatici, del 32% negli oligosintomatici e del 39,13% negli asintomatici; per l'immunofluorescenza diretta, del 92,68% nei sintomatici, del 60% negli oligosintomatici e del 73,91% negli asintomatici; per l'immunocitochimica, del 92,68% nei sintomatici, del 76% negli oligosintomatici e del 73,91% negli asintomatici; per la PCR, del 100% nei sintomatici, del 96% negli oligosintomatici e del 95,65% negli asintomatici.

nella prognosi, mentre l'*immunoblotting*, almeno per quest'ultimo aspetto, sarebbe una metodica più indicativa (Medrano *et al.*, 1998). Comunque sia, nell'ambito del monitoraggio terapeutico, per capire cioè se, durante la terapia, il soggetto risponde e se, alla fine del ciclo, ha risposto, la strada da seguire non sembra semplice. Mancianti e Franceschi (2006) propongono un protocollo di *follow-up*, applicato esemplificativamente alla classica terapia AnM + allopurinolo per 2 mesi:

1. Prima dell'inizio della terapia: IFAT; PCR qualitativa (su sangue, biopsia linfonodale, cutanea o tampone congiuntivale) e quantitativa (come la PCR *real-time*); striscio da puntato linfonodale per la ricerca degli amastigoti; LST (*Leishmanin Skin Test*); parametri clinico-laboratoristici come il rapporto PU/CU, PT ed A/G, esame emocromocitometrico, profilo biochimico di base;
2. Al giorno 14 di terapia: IFAT e le PCR;
3. Al giorno 28 di terapia: IFAT, le PCR e parametri clinico-laboratoristici;
4. Alla fine della terapia (giorno 62): come in (1.).

Per ridurre i costi, dal piano potrebbero essere sottratti i controlli di cui al precedente punto (2.).

3.2.1.5. *Immunomigrazione rapida*

Si tratta di semplici metodi ambulatoriali, che offrono il vantaggio della facilità e della praticità di esecuzione, anche se presentano specificità e sensibilità diverse e quindi un'efficienza diagnostica sensibilmente inferiore alle metodiche sierologiche tradizionali (Rivò *et al.*, 2000; Mancianti, 2001; Paltrinieri *et al.*, 2007). Questi kit possono creare problemi interpretativi a basso titolo anticorpale, allorché la reazione appare evanescente (casi dubbi: di solito questi campioni risultano negativi all'IFAT), e spesso forniscono risultati tra loro contrastanti (Mancianti, 2001). In genere la specificità è medio-alta, mentre la sensibilità è bassa, potendo fornire risultati falsamente negativi in percentuali certamente non trascurabili (fino al 24%). In caso di positività, non viene fornita alcuna informazione sul titolo anticorpale, di potenziale utilità, per esempio, nel monitoraggio della risposta alla terapia (Mancianti, 2001; Paltrinieri *et al.*, 2007). Visto il potenziale notevole di questi test, quanto a praticità,

facilità e velocità d'esecuzione, sarebbe opportuno un miglioramento delle metodiche per aumentarne specificità e sensibilità (Alvar *et al.*, 2004). L'antigene rK39 è stato impiegato anche con questo genere di metodi. Il primo saggio sul campo⁹⁶ però, allestito sulla scorta dei buoni risultati ottenuti nella diagnosi di leishmaniosi viscerale umana, in comparazione con l'ELISA e la PCR, fornì risultati poco confortanti (sensibilità 72-77%, specificità 61-75%,) (Reithinger *et al.*, 2002), probabilmente, per quanto riguarda la scarsa specificità, a causa di una cross-reazione con un fattore sconosciuto nel sangue dei cani (Alvar *et al.*, 2004). Un altro studio⁹⁷ ha comparato i risultati del *dipstick* rK39 con il DAT, ottenendo valori di sensibilità e specificità rispettivamente del 70,9% e dell'84,9% (Mohebbi *et al.*, 2004). Otranto e coll. (2005)⁹⁸ hanno invece ottenuto risultati molto più incoraggianti, addirittura sovrapponibili a quelli dell'IFAT (sensibilità relativa rK39 97,06%, IFAT 98,53%; specificità relativa rK39 100%, IFAT 98,53%).

La metodica sierologica del *Western blotting* è risultata più sensibile dell'IFAT e dell'ELISA ed anche molto valida nel monitoraggio in corso ed alla fine della terapia (Carrera *et al.*, 1996; Fernández-Pérez *et al.*, 1999; Fernández-Pérez *et al.*, 2003). In considerazione però della mancanza di standardizzazione nel processo di estrazione antigenica e nella valutazione del profilo delle bande tra i diversi laboratori, la metodica non può essere utilizzata nella pratica, per lo meno per la diagnosi primaria (Alvar *et al.*, 2004).

3.2.2. Valutazione della risposta immunitaria cellulare

L'argomento è stato in parte già affrontato nel paragrafo dell'immunologia⁹⁹. Sulla base di quanto asserito in quella sede - riassumendo: i soggetti infetti con malattia clinicamente manifesta mostrano una risposta immunitaria prevalentemente umorale e non protettiva (simil-Th2), mentre i soggetti infetti che non sviluppano la malattia mostrano una risposta immunitaria prevalentemente cellulare e protettiva (simil-Th1) (Ferrer *et al.*, 2000) - nella pratica clinica sarebbe molto utile disporre di tecniche semplici, veloci e di basso costo, che permettano di determinare l'intensità

⁹⁶ Brasile.

⁹⁷ Iran.

⁹⁸ Italia.

⁹⁹ 2.3.1

della risposta immunitaria cellulare nei cani leishmaniotici, al fine di stabilire la prognosi e di valutare la risposta alla terapia. Il test cutaneo alla leishmanina (LST, reazione di Montenegro) è certamente il metodo più facilmente applicabile in condizioni pratiche, anche se la necessità del *follow-up* a 72 ore dall'inoculo, la variabilità intrinseca comune ad ogni test in vivo e la possibilità di indurre falsi positivi iatrogeni in seguito a test ripetuti, ne minano la fruibilità (Fernández-Bellon *et al.*, 2005). Una tecnica alternativa potrebbe essere la determinazione della variazione delle diverse sottopopolazioni linfocitarie ematiche in corso di terapia: ci sono diverse pubblicazioni sull'utilizzo in questo senso della citometria di flusso¹⁰⁰. In base a queste, risulta che nei cani malati si assiste ad una riduzione della percentuale dei linfociti T CD4+ e del rapporto CD4/CD8+, che si normalizzano in seguito alla terapia ed alla guarigione clinica (Bourdoiseau *et al.*, 1997[1]; Moreno *et al.*, 1999; Guarga *et al.*, 2000, 2002). Molti di questi studi, però, sono stati condotti su un numero di casi esiguo e con *follow-up* brevi od assenti. Ci sono però anche segnalazioni di difetti di affidabilità dello studio delle sottopopolazioni linfocitarie, a fini prognostici e di monitoraggio terapeutico. Pertanto, attualmente, mancando univocità, tali metodiche non rappresentano delle buone rappresentazioni della risposta cellulomediata. Dal momento che la risposta immunologica al parassita dipende eminentemente dalla componente cellulare del sistema immunitario, e che nella specie canina è stato dimostrato che gli animali infetti che non sviluppano la malattia o che rispondono bene al trattamento, presentano una risposta immunitaria eminentemente cellulare, l'indicatore di prima scelta per lo studio dell'evoluzione della malattia e dello stato immunologico individuale, molto probabilmente è rappresentato dal profilo delle citochine espresse dalle cellule mononucleate del sangue periferico, in particolare IL-4, IFN- γ ed IL-2 (Miranda *et al.*, 2007). de Lima e coll. (2007) hanno dimostrato che nel sangue dei cani con malattia attiva, aumentano i livelli di IL-6, non correlati direttamente con il titolo anticorpale. Moreno e Alvar (2002) hanno dimostrato che nell'infezione sperimentale da *L. infantum* l'immunità protettiva è associata alla produzione di IL-2, IFN- γ e TNF- α da parte delle cellule mononucleate del sangue periferico. Manna e coll. (2006) hanno dimostrato che i soggetti infetti asintomatici che esprimono alti livelli di IL-2 e IFN- γ , tendono anche a restare asintomatici durante

¹⁰⁰ Nonostante la trattazione in questa sede per ragioni logiche, non si tratterebbe di metodi diagnostici specifici.

il *follow-up* di 2 anni; invece altri soggetti infetti asintomatici, il cui sangue periferico non esprime le dette citochine, nel corso del *follow-up* diventano sintomatici, con la comparsa delle stesse: gli Autori suggeriscono che la rilevazione di IL-2 e IFN- γ , in assenza di sintomi, può essere associata con la protezione nei confronti della progressione dell'infezione verso la malattia conclamata, e quindi affermano che le due citochine possono rappresentare dei buoni *marker* per predire l'evoluzione dell'infezione in soggetti asintomatici.

3.2.2.1. Test cutaneo alla leishmanina (LST, reazione di Montenegro)

L'LST¹⁰¹ - tecnica che rileva l'ipersensibilità ritardata (Pearson *et al.*, 2001) - consiste nell'inoculazione intradermica di antigeni di *Leishmania* (3×10^8 promastigoti inattivati) ed in sospensione in una soluzione salina sterile¹⁰² (0,1 ml), solitamente a livello addominale; a 48 e/o 72 ore viene valutato il diametro dell'eventuale reazione cutanea (diametro orizzontale e/o verticale), sotto forma di un'area indurita, allargata e rilevata e/o arrossata; il test è considerato positivo - espressione di un'efficace immunità cellulare - se l'area ha diametro \geq a 5 mm (Pinelli *et al.*, 1994; Cardoso *et al.*, 1998). In genere l'LST, pur essendo un buon metodo¹⁰³, da solo non è considerato sufficientemente indicativo della risposta cellulare efficace, per cui dovrebbe essere associato con altre rilevazioni immunologiche e/o cliniche (Paranhos-Silva *et al.*, 2001), come il *biotest* di inibizione dell'effetto citopatico dell'IFN- γ (IFNB) (Fernández-Bellon *et al.*, 2005). Abbinando i risultati della sierologia e dell'LST, Solano-Gallego e coll. (2005) hanno dimostrato che nelle aree altamente endemiche, cani infetti ma asintomatici, soprattutto se vivono all'aperto, mostrano un aumento della risposta immunitaria specifica nel corso del tempo, non solo di quella umorale ma anche di quella cellulare; inoltre, alcuni soggetti LST-positivi, vanno incontro anche a sieroconversione, probabilmente un anno dopo

¹⁰¹ Un ruolo fondamentale nello sviluppo della reazione è rivestito dalle cellule dendritiche (DCs), che vanno incontro a modificazioni ultrastrutturali, in seguito alla stimolazione antigenica, con *up-regulation* della sintesi e dell'espressione degli antigeni MHC-II (Sacchi *et al.*, 2006).

¹⁰² PBS o soluzione salina di mertiolato. L'utilizzo di soluzioni contenenti thimerosal è rischioso, in quanto è stato dimostrato che, anche senza l'antigene, possono determinare delle reazioni sovrapponibili a quelle che si hanno in presenza di antigene (infiltrazioni infiammatorie costituite prevalentemente da macrofagi con grande citoplasma granulare, alcuni linfociti e neutrofili, associati a cellule necrotiche) (Paranhos-Silva *et al.*, 2001).

¹⁰³ Per quanto riguarda la leishmaniosi cutanea americana umana (*L. braziliensis*), è stato dimostrato che pazienti con LST negativo hanno un rischio 3,4 volte superiore di andare incontro a recidiva (Passos *et al.*, 2000).

l'infezione (nell'infezione sperimentale risulta invece che essa si realizza 2-3 mesi dopo). Questo può essere spiegato in vari modi, come la persistenza di una certa carica parassitaria che può determinare una continua stimolazione delle cellule T della memoria e quindi una protezione dalle reinfezioni. I soggetti asintomatici, comunque, rappresentano un insieme caratterizzato da un'ampia variabilità individuale, per quanto riguarda la risposta immunitaria, per cui appare difficile standardizzare i metodi diagnostici per valutarne il grado di protezione e la resistenza alla progressione della malattia nel tempo: Rodríguez-Cortés e coll. (2007) non hanno riscontrato alcuna correlazione tra i risultati dei test cellulari (LST, IFNB ed LPA¹⁰⁴) ed i livelli di specifici isotipi anticorpali (IgG ed IgM), con l'esclusione della correlazione inversa tra i livelli di IgA e la risposta all'LPA. In generale, questa mancanza di correlazione o comunque un basso grado di correlazione, indica che nella maggior parte dei cani asintomatici non si realizza una netta polarizzazione della risposta immunitaria. Questi dati possono far ipotizzare che nei soggetti in cui si sviluppa una forte risposta cellulare, viene impedita la disseminazione del parassita.

3.2.3. Esame colturale

L'esame colturale è uno dei metodi più specifici in quanto nelle aree endemiche del Vecchio Mondo lo sviluppo in coltura di promastigoti vitali è ascrivibile unicamente al genere *Leishmania*; purtroppo però richiede tempi piuttosto lunghi (Paltrinieri *et al.*, 2007). L'utilità del metodo non è solo diagnostica, ma anche a fini di studio delle relazioni ospite-parassita e delle caratteristiche biologiche ed immunologiche del parassita stesso (Sharief *et al.*, 2008). L'isolamento può avvenire abbastanza agevolmente da uomo, cane, animali selvatici, animali di laboratorio e flebotomi infetti (xenodiagnosi). Il primo a dimostrare la possibilità di isolare e coltivare ceppi di *Leishmania*, fu Roger nel 1904. In seguito sono stati allestiti diversi terreni colturali, tra cui i più utilizzati sono quelli difasici, alla cui parte solida (agar) viene aggiunto sangue di coniglio citrato o defibrinato, preventivamente inattivato per 30 minuti a 56 °C, come il Novy-McNeal-Nicolle (NNN) o il terreno di Tobie modificato da Evans (Degl'Innocenti *et al.*, 1989). Possono essere utilizzati anche terreni semisolidi e liquidi. Mentre i terreni difasici e semisolidi necessitano di sangue, fattore importante per la riproduzione dei parassiti, la maggior parte di quelli liquidi

¹⁰⁴ Test di linfoproliferazione.

necessita di siero fetale bovino¹⁰⁵ o lisati eritrocitari. Il terreno NNN è stato utilizzato a lungo soprattutto per la sua semplicità e perché molto più economico dei terreni commerciali; è ottimo per l'isolamento, soprattutto da biopsie midollari, spleniche e cutanee, in particolare degli agenti eziologici di leishmaniosi viscerale, ma i campioni prelevati da pazienti leishmaniotici difettano nel fornire elevate quantità di promastigoti in breve tempo (Limoncu *et al.*, 1997). È formato da una fase solida - costituita dall'agar a cui viene aggiunto il sangue di coniglio (circa 15%) - ed una fase liquida - costituita dall'acqua a cui, facoltativamente, può essere aggiunta un'ulteriore parte liquida (soluzione salina bilanciata, come la PBSS¹⁰⁶) (Evans, 1993); viene incubato a 22 °C: solitamente lo sviluppo dei promastigoti è già evidente in 8-10 giorni; se così non fosse, il campione d'origine non deve essere considerato negativo prima che siano trascorse 4 settimane (García-Rodríguez, 1999). In uno studio recente, il 77,1% delle colture (da biopsie spleniche, linfonodali, midollari ed epatiche) si è positivizzato nella prima settimana, ed il 23% circa si è positivizzato nella seconda e terza settimana: ciò sottolinea il bisogno di operare delle sottocolture almeno fino a 3 settimane. I campioni splenici e linfonodali danno maggiori probabilità d'isolamento rispetto a quelli midollari e, soprattutto, a quelli epatici (Maia *et al.*, 2007). Il **terreno di Tobie modificato da Evans** è più arricchito dell'NNN ed è ottimo per l'isolamento delle leishmanie sia del Vecchio che del Nuovo Mondo; la fase solida è costituita da estratto di carne di manzo, peptone batteriologico, NaCl, agar ed acqua distillata; la fase liquida, formata da PBSS, viene aggiunta immediatamente prima dell'inoculazione del campione. Il sangue di coniglio può essere sostituito da quello di pecora, cavallo o uomo. I terreni difasici possono essere conservati a 4 °C e durano al massimo 3 settimane, dando però i migliori risultati entro la prima settimana (Evans, 1993). Il mantenimento di stipiti di *Leishmania* in terreni artificiali, necessario per ottenere l'antigene da utilizzare nelle reazioni sierologiche, è possibile tramite passaggi settimanali o quindicinali su terreno fresco. La temperatura a cui vengono mantenute le colture varia tra 22 e 28 °C, con un *optimum* a 25 °C (Degl'Innocenti *et*

¹⁰⁵ Dal 10 al 30% nel terreno *Drosophila* di Schneider e nel terreno di Grace (piuttosto costosi, utili quando si vogliono mantenere colture di grandi dimensioni); 10% nell'MEM (*Minimal Essential Medium*; più economico dei due precedenti, ma dopo 2-3 passaggi, i promastigoti muoiono) (Evans, 1993). Recentemente è stato dimostrato che sostituendo il siero fetale bovino con il latte di capra, vacca o bufala (10%), si ottengono migliori risultati nella crescita dei promastigoti (Muniaraj *et al.*, 2007).

¹⁰⁶ *Proline Balanced Salt Solution*.

al., 1989)¹⁰⁷. In genere *Leishmania* cresce relativamente bene, anche se deve essere tenuto presente il rischio del cosiddetto “fenomeno dell’isolamento”: i promastigoti crescono meglio quando ci sono diversi microrganismi vicini gli uni agli altri, per cui la semina di piccoli *inoculi* in grandi volumi di terreni freschi solitamente fallisce; per evitare questo problema, è bene che il rapporto non sia superiore ad 1 volume di inoculo per 4 volumi di terreno. L’utilizzo di *routine* degli antibiotici nelle colture è un errore; andrebbero impiegati solo nel caso di campioni microbiologicamente contaminati, come quelli cutanei: in genere è sufficiente della gentamicina alla concentrazione di 50-100 µg/ml; se non lo è, si può aumentare fino a 250 (tenendo presente che spesso questa concentrazione rallenta considerevolmente la crescita dei promastigoti) o cambiare antibiotico (penicillina 1.000 U/ml + streptomicina 200 µg/ml). La contaminazione fungina è più difficile da combattere, in quanto la maggior parte dei farmaci antimicotici sono anche leishmanicidi¹⁰⁸ (Evans, 1993).

Per migliorare l’efficienza dell’isolamento in coltura, i metodi tradizionali vengono continuamente aggiornati e modificati, sia per quanto riguarda la composizione che le modalità operative; è il caso, per esempio, dei metodi descritti da Limoncu e coll. (1997)¹⁰⁹, Allahverdiyev e coll. (2004) e Sharief e coll. (2008): quest’ultimo, denominato CML, risulta innovativo perché non contiene siero né sangue intero ed è costituito fondamentalmente da sali, zuccheri, emina, purine e nucleosidi purinici (essenziali per il parassita), un’alta concentrazione di vitamine idrosolubili (B₁, B₂, B₆, C, acido folico, biotina), aminoacidi e Tween 80; risulta relativamente economico, abbastanza facile da preparare, ha una discreta durata (45-60 giorni) ed è risultato di ottima efficienza, non inferiore a quella dei terreni commerciali.

¹⁰⁷ Alcune specie di *Leishmania* non crescono a partire da 27 °C in su; per cui è bene considerare la temperatura di 25 °C come quella massima (Evans, 1993).

¹⁰⁸ Alcuni lieviti possono essere controllati con la 5-fluorocitosina in concentrazioni fino a 500 µg/ml, ma i funghi filamentosi sono più difficili da eradicare: si può cercare di separare i promastigoti dai miceti, tramite una centrifugazione ad 800g per 10 minuti, per poi riseminare la sospensione con i promastigoti in un terreno fresco non contaminato.

¹⁰⁹ Denominato P-Y.

4. PCR

4.1. Generalità

La *Polymerase Chain Reaction* - reazione a catena della polimerasi - è una metodica specifica indiretta (Alvar *et al.*, 2004) che permette l'amplificazione di sequenze specifiche del DNA di *Leishmania*. È una tecnica molto specifica e, soprattutto, sensibile, se viene utilizzata per l'amplificazione di sequenze genomiche "multicopia", ovvero presenti in numero elevato in ogni singolo parassita, come il DNA dei minicircoli del cinetoplasto. Quindi è in grado di identificare piccolissime quantità di DNA presente nel materiale biologico in esame (Paltrinieri *et al.*, 2007).

La PCR può essere considerata una versione semplificata del processo di replicazione del DNA che si verifica durante la divisione cellulare. Fondamentalmente la PCR si divide in tre fasi: 1) denaturazione termica del DNA *target*¹¹⁰, 2) appaiamento (*annealing*) dei *primer*¹¹¹ oligonucleotidici sintetici¹¹², 3) estensione dei *primer* appaiati da parte di una DNA-polimerasi¹¹³. Queste fasi vengono ripetute per un certo numero di cicli, in ognuno dei quali si ha approssimativamente la duplicazione dei prodotti molecolari. Il fattore di amplificazione è dato dall'equazione $x(1 + E)^n$, dove x è il numero dei *target* iniziali, E è l'efficienza dell'amplificazione ed n è il numero dei cicli della PCR. Dopo pochi cicli, le dimensioni del prodotto sono determinate dalla distanza tra i terminali 5' dei due *primer*. La PCR convenzionale in

¹¹⁰ Una causa frequente di fallimento della PCR è l'inadeguata denaturazione del DNA bersaglio. Lo e Chan (2006) consigliano di eseguire una prima denaturazione a 94 °C per 8 minuti, durante i quali può essere attivata una *Taq* polimerasi modificata (come l'*AmpliTaq Gold*®); per i cicli successivi è in genere adeguata la stessa temperatura per 1-2 minuti. Dato che i bersagli degli ultimi cicli della PCR sono rappresentati principalmente dai prodotti della PCR stessa, piuttosto che dal DNA genomico, è stato suggerito di diminuire la temperatura di denaturazione dopo i primi 10 cicli, per evitare l'eccessiva denaturazione della *Taq* polimerasi. L'emivita della *Taq* DNA-polimerasi è superiore a 2 ore a 92,5 °C, 40 minuti a 95 °C e 5 minuti a 97,5 °C.

¹¹¹ I *primer* sono sequenze di basi complementari alla sequenza *target* contenuta nel DNA di *Leishmania* (Paltrinieri *et al.*, 2007).

¹¹² La temperatura ed il tempo necessari per l'appaiamento, dipendono dalla composizione di base e dalla lunghezza e concentrazione dei *primer*. Se si usano *primer* di 18-30 basi contenenti il 50% circa di GC, si può iniziare con 55 °C per 1-2 minuti. Per alcune coppie *primer-template*, una differenza della temperatura di appaiamento di soli 1-2 °C, può fare la differenza tra un'amplificazione specifica e non specifica. Se la temperatura di appaiamento è > 60 °C, è possibile combinare l'appaiamento con la fase di estensione in un ciclo PCR in due fasi.

¹¹³ L'estensione viene tipicamente eseguita a 72 °C, che è vicino all'*optimum* di temperatura della *Taq* polimerasi.

genere è eseguita in volumi di 10-100 μ l. Nella composizione dei reagenti sono compresi: trifosfati desossinucleotidici (dNTP: dATP, dCTP, dGTP e dTTP) alla concentrazione di 200 μ M ciascuno, da 10 a 100 pmol di ciascun *primer*, sali, tamponi e DNA-polimerasi. I *primer* sono allestiti per affiancare la sequenza bersaglio ed in genere hanno una lunghezza compresa tra 18 e 30 basi, con un contenuto in GC del 50% circa. Deve essere evitata la complementarietà al terminale 3', al fine di diminuire la probabilità che si formino artefatti *primer*-dimeri. In certi casi l'appaiamento di alcuni *primer* fallisce senza alcun motivo apparente; in questi casi la soluzione più semplice è quella di sostituire uno dei due od entrambi i *primer*. In una singola reazione PCR possono essere inclusi diversi set di *primer* per l'amplificazione simultanea di differenti *target* di uno stesso DNA (PCR *multiplex*); in tale circostanza, per ottenere un'efficienza elevata in tutte le reazioni, le temperature di fusione devono essere il più possibile simili. La quantità dei prodotti molecolari ottenibili in una reazione PCR è limitata dall'effetto *plateau*¹¹⁴, che è determinato dall'accumulo delle molecole stesse, con un grado significativo di appaiamento tra filamenti prodotti complementari, piuttosto che tra *primer* e *template*; inoltre la quantità finita delle molecole enzimatiche, ad un certo punto, non è più in grado di estendere tutti i complessi *primer-template*. La sensibilità della PCR è correlata al numero delle molecole *target*, alla complessità di quelle non-*target* ed al numero dei cicli. In genere la reazione è in grado di eseguire l'amplificazione a partire da una singola molecola bersaglio; in questi casi la singola molecola *target* è inserita in un tampone apposito, cioè in un ambiente a bassa complessità. Nelle situazioni in cui la complessità è elevata, l'affidabilità della PCR-singola molecola si abbassa e debbono essere applicati metodi particolari, come la PCR *nested* e la PCR *Hot Start*. La straordinaria sensibilità della metodica ha comunque reso possibile il suo impiego anche su materiali parzialmente degradati, come i campioni fissati in formalina ed in paraffina (Lo e Chan, 2006).

Per quanto riguarda l'analisi e l'elaborazione dei prodotti della PCR, in genere si possono usare gli stessi metodi impiegati per il DNA convenzionale:

- Elettroforesi: il metodo comune è l'utilizzo dell'elettroforesi su gel di agarosio, in cui viene inserito uno speciale colorante (bromuro di etidio),

¹¹⁴ Per una PCR con 100 μ l il *plateau* è di circa 3-5 pmol.

che permette la successiva evidenziazione delle bande di migrazione alla luce ultravioletta. L'elettroforesi capillare aumenta significativamente la risoluzione analitica che può permettere la discriminazione di una differenza di dimensioni di un singolo nucleotide;

- Restrizione dei prodotti della PCR;
- Ibridazione oligonucleotidica sequenza-specifica (metodo molto efficace per rilevare la presenza di polimorfismi in una regione amplificata dalla PCR);
- Clonazione dei prodotti della PCR (può avvenire facilmente utilizzando la tecnologia DNA-ricombinante convenzionale);
- Spettrometria di massa;
- PCR *real-time*: può essere incorporata nella reazione PCR una sonda fluorescente ibridizzata ad una regione compresa tra i terminali 3' dei *primer*. Durante ogni ciclo della PCR, le sonde fluorescenti dovrebbero aderire, aumentando l'intensità della fluorescenza stessa, che è proporzionale al numero dei frammenti di nuova sintesi. Quindi il vantaggio più evidente della PCR *real-time* è che permette la determinazione della quantità dei *template* iniziali (Lo e Chan, 2006).

4.2. Contaminazioni

La straordinaria sensibilità è il più importante vantaggio della PCR ma, allo stesso tempo, rappresenta uno svantaggio, per il pericolo di risultati falsi positivi, a causa delle contaminazioni da parte di DNA estraneo (esogeno) al campione in esame (Lo *et al.*, 1988; Kwok e Higuchi, 1989; Lo e Chan, 2006). Fondamentalmente ci sono 4 fonti di contaminazione: 1) prodotti di precedenti amplificazioni (le fonti di contaminazione più importanti; può avvenire che una singola molecola, tra le milioni che vengono generate in una singola reazione, sia sufficiente a dare un risultato falso positivo); 2) DNA clonato, trattato in precedenza nel laboratorio; 3) contaminazione tra campioni (interessa soprattutto quelli che debbono essere trattati abbondantemente prima dell'amplificazione); 4) l'onnipresente DNA *template* nell'ambiente,

proveniente dal personale di laboratorio e dai reagenti impiegati nell'estrazione del DNA e nella PCR stessa. Per evitare le contaminazioni, possono essere seguite alcune regole organizzative ed operative all'interno del laboratorio, a partire dalla stretta separazione fisica delle diverse fasi correlate alla procedura; sono consigliabili tre aree distinte: una per la preparazione del campione, una per la configurazione della PCR ed una per la fase post-PCR. Inoltre: in tutte le fasi i guanti usa e getta devono essere cambiati frequentemente; i reagenti vanno suddivisi in aliquote e, se possibile, autoclavati; il numero dei cicli della PCR dovrebbe essere il minimo indispensabile; se possibile, nelle diverse aree, dovrebbe essere impiegato personale differente o, in alternativa, le fasi pre- e post-PCR andrebbero eseguite in giorni diversi. Si possono utilizzare misure anti-contaminazione: raggi UV che, applicati prima dell'aggiunta del DNA *template*, danneggiano l'eventuale DNA contaminante; trattamento con enzimi di restrizione o DNAsi. Il monitoraggio delle contaminazioni ha la stessa importanza delle misure per prevenirle; per questo, in ogni reazione PCR, andrebbero inclusi dei controlli negativi. Se viene individuata una contaminazione, ogni lavoro deve essere interrotto finché la stessa non è eliminata. Nella maggior parte dei casi è sufficiente gettare i reagenti sospetti; se tutta la strumentazione risulta contaminata, può essere necessaria una pulitura a fondo o la sostituzione di tutti i materiali contaminati. Nei casi più gravi, l'unico metodo davvero efficace si rivela la sostituzione del set di *primer* con uno che amplifica un diverso segmento del DNA (Lo e Chan, 2006).

4.3. Standardizzazione

Un'altra questione importante che riguarda la ricerca e lo sviluppo delle implementazioni della PCR, è la scarsità della standardizzazione e del controllo di qualità. È sorprendente constatare che, tra le centinaia di lavori pubblicati dal 1989 al 2007, solo pochi hanno comparato i diversi protocolli disponibili, per quanto riguarda il campionamento delle biopsie, l'estrazione del DNA e l'utilizzo dei vari *primer*. Tra l'altro, alcune di queste prove comparative, hanno fornito risultati anche molto diversi le une dalle altre. È dunque importante usare molta cautela nella comparazione dei diversi studi, considerando il contesto clinico ed i criteri clinici e laboratoristici impiegati per la definizione dei casi e dei "non-casi". Mancando un vero *gold standard* nella diagnosi di leishmaniosi, queste considerazioni possono avere importanti conseguenze nella valutazione della sensibilità e della specificità dei vari

protocolli. Gli studi comparativi dovrebbero essere incoraggiati ed aggiornati agli sviluppi delle ultime tecnologie e, cosa ancora più importante, dovrebbero essere condotti in senso multicentrico, con un numero adeguato di campioni, per permettere una valutazione comparativa statisticamente attendibile (Reithinger e Dujardin, 2007).

Tabella 10 - Guida pratica schematica alla diagnosi molecolare di leishmaniosi (da Reithinger e Dujardin, 2007, modificato).

FASE	DESCRIZIONE
Generalità	È stata sviluppata una miriade di protocolli PCR per la rilevazione del DNA di <i>Leishmania</i> nei campioni clinici. Nei protocolli la sensibilità e la specificità possono variare considerevolmente, in base a: impostazioni del laboratorio; origine, stoccaggio e trattamento dei campioni; protocollo di estrazione del DNA; scelta dei <i>primer</i> ; metodologia della PCR.
Campionamento	Nei protocolli vengono impiegate grandi varietà di campioni: biopsie cutanee, raschiati, impronte, strisci, essudati ed aspirati (forme cutanee e mucose); agoaspirati splenici, linfonodali e midollari (soprattutto forme viscerali); tamponi congiuntivali; sangue intero, <i>buffy coat</i> e siero. I campioni andrebbero prelevati in duplicato.
Trasporto dei campioni	In base al materiale prelevato, i campioni vanno utilizzati freschi o inseriti in provette, su carta da filtro o su vetrini; spesso è necessaria l'aggiunta di reagenti (per es.: tamponi) per stabilizzarli. Se non usati freschi, i campioni raccolti sul campo vanno conservati adeguatamente, solitamente tramite refrigerazione (4 °C) o congelamento (-20 °C); lunghi periodi di conservazione, richiedono temperature da -40 °C in giù.
Pretrattamento dei campioni	Prima dell'estrazione del DNA, ci sono diversi metodi per incrementare la resa e la probabilità di rilevare del DNA patogeno in un campione clinico: sonicazione, incubazione con proteasi, lisi tramite tamponi.
Estrazione del DNA	I protocolli di estrazione standard impiegano fenolo-cloroformio, resina Chelex o silice. Sono comunque disponibili molti kit commerciali di buona efficacia. Il DNA estratto va diluito in acqua prima dell'amplificazione, per prevenire l'inibizione della PCR.
Scelta dei <i>primer</i>	Sono disponibili molti <i>primer</i> PCR con bersaglio a livello del cinetoplasto, del gene dell'rRNA, dei geni mini-esonici e di sequenze genetiche specifiche (glicoproteine, proteine <i>heat shock</i> , cistein-proteinasi). I <i>primer</i> possono essere geni, sub-geni o specie-specifici.
Fasi ulteriori	Una volta ottenuta l'amplificazione, l'approccio convenzionale è quello di visualizzare i prodotti, processati in elettroforesi su gel di agarosio e colorati con bromuro di etidio, sotto luce UV. Questo passaggio non è richiesto dagli sviluppi più recenti della PCR, come nella PCR <i>real-time</i> ed in quella oligocromatografica. La sensibilità e la specificità di molti protocolli possono essere incrementate con l'ibridazione tramite sonde genetiche o specie-specifiche. Originariamente queste sonde venivano marcate con isotopi radioattivi, ma oggi in genere vengono utilizzati coloranti fluorescenti. La specificità può essere aumentata anche con la separazione tramite enzimi di restrizione, che permettono di ottenere dei profili specie- o stipite-specifici, visualizzabili in seguito ad elettroforesi.
Standardizzazione	Ogni PCR dovrebbe includere almeno: controlli di estrazione del DNA (campioni con quantità conosciute di DNA patogeno, un campione con acqua), controlli dell'amplificazione interna (DNA dell'ospite), controlli negativi e positivi. Dovrebbero essere eseguiti test replicati. Infine i laboratori si dovrebbero dotare di sistemi esterni di controllo di qualità.

4.4. PCR quantitativa

La PCR standard richiede l'analisi elettroforetica dei prodotti di amplificazione e non permette la quantificazione del DNA *target* del campione in esame; può essere

dunque di limitata utilità, soprattutto nei casi in cui sia richiesto il monitoraggio del parassita. Per superare queste limitazioni sono state approntate metodiche di PCR quantitativa che permettono la misurazione della carica parassitaria in pazienti affetti da malattie croniche, il monitoraggio del trattamento e dei soggetti che rispondono o che non rispondono alla terapia. In questo senso, risulta particolarmente utile la possibilità di sottoporre ad esame il sangue periferico, la cui raccolta è di facile esecuzione e poco invasiva. Tra le metodiche quantitative, ha riscosso un grande successo la **PCR *real-time***: permette il monitoraggio dei prodotti ciclo per ciclo (“in tempo reale”), per cui è possibile determinare in quale ciclo (“ciclo soglia”) tali prodotti cominciano ad accumularsi in maniera esponenziale. È così possibile quantificare, per inferenza ed in termini relativi, il DNA *template* presente all’inizio della reazione, con precisione e riproducibilità. Da questa quantificazione deriva la stima della carica parassitaria relativa nei diversi campioni in esame; la quantificazione assoluta viene ottenuta in riferimento ad uno standard interno, amplificato contemporaneamente al DNA campione, oppure in riferimento ad uno standard esterno, ottenuto tramite amplificazione di diverse concentrazioni note di un campione di riferimento in reazioni parallele. In genere, per il monitoraggio dei prodotti che si formano durante la reazione, vengono impiegate sonde fluorescenti. Un sistema di rilevazione aspecifico, che può essere potenzialmente applicato ad ogni *target*, è quello che si basa sulla tecnologia SYBR® Green, la quale impiega un intercalante fluorescente del DNA a doppia elica. Il sistema TaqMan® è più specifico, permettendo la misurazione diretta della quantità di DNA amplificato, tramite una sonda fluorescente, che viene scelta in modo da ibridare con un tratto di sequenza *target* interna al bersaglio delimitato dalla coppia di *primer*. La sonda è formata da un oligonucleotide con, alle estremità, una molecola *reporter* (fluorescente) ed una *quencher*, la quale assorbe il segnale generato dal *reporter*. Il protocollo termico è impostato in modo che la sonda fluorescente si leghi alla sequenza bersaglio prima dei *primer*, ovvero prima che inizi la polimerizzazione da parte della *Taq* polimerasi; durante quest’ultimo processo, la sonda viene scalzata e digerita liberando il *reporter* e rendendo possibile la rilevazione della fluorescenza, la cui intensità aumenta ad ogni ciclo, in dipendenza della quantità del prodotto della PCR (Mortarino *et al.*, 2004).

La misurazione della carica parassitaria di *L. infantum* tramite PCR *real-time* può costituire un valido metodo per il monitoraggio della terapia nei cani

leishmaniotici, così come per la previsione delle recidive, associate ai parassiti che restano vitali dopo il trattamento (Mortarino *et al.*, 2004). La PCR *real-time*, benché meno sensibile della PCR qualitativa, può dunque fornire valide informazioni sull'eventuale diminuzione della carica parassitaria in risposta alla terapia, mentre l'applicazione congiunta della PCR qualitativa e dell'IFAT, che sovente restano positivi in corso di trattamento ed alla fine dello stesso, può portare a conclusioni sbagliate sulla mancata efficacia della terapia (Mancianti e Franceschi, 2006). Anche nella patologia umana con coinfezione *Leishmania*-HIV, è stato dimostrato che i livelli di DNA del parassita sono in correlazione con il decorso della patologia e che il monitoraggio dei livelli dell'acido nucleico nel sangue periferico, prima e durante il trattamento, è utile nella gestione clinica dei pazienti¹¹⁵ (Bossolasco *et al.*, 2003).

4.5. Applicazioni pratiche

A prescindere dall'indubbia utilità in senso diagnostico "puro" (prima diagnosi), affinché la PCR possa divenire il metodo definitivo per la diagnosi di leishmaniosi canina, applicabile al monitoraggio clinico anche in corso di terapia, bisognerebbe che fosse dimostrata, per quanto possibile, una chiara correlazione tra carica parassitaria e stato del paziente (Ferroglio e Vitale, 2006). La PCR può essere utilizzata su: midollo osseo, linfonodi, cute, congiuntiva, *buffy coat*, sangue periferico. Paltrinieri e coll. (2007) considerano il precedente ordine come quello con sensibilità decrescente; ma ci sono studi che non concordano; per esempio Solano-Gallego e coll. (2001[2]) riportano delle prevalenze d'infezione, in un'area iperendemica, del 17,8% per il midollo osseo, del 32% per la congiuntiva e del 51% per la cute (regione superiore del muso, molto accessibile ai flebotomi)¹¹⁶. Bisogna tenere presente che l'inoculazione del parassita a livello cutaneo può non essere seguita da disseminazione, per cui un'eventuale positività cutanea in assenza di lesioni specifiche, in area endemica, non necessariamente significa che il cane sia infetto e sviluppi la malattia; analogamente, anche positività midollari, possono poi andare incontro a negativizzazione (Mancianti 2001; Alvar *et al.*, 2004; Paltrinieri *et al.*, 2007). Il problema della definizione della

¹¹⁵ Nel lavoro in questione è emerso anche che tutti i pazienti andati incontro a ricaduta, hanno mantenuto la positività alla PCR su sangue periferico.

¹¹⁶ Secondo gli Autori, la bassa percentuale di positività alla PCR delle biopsie midollari del loro studio, può essere spiegata col fatto che non in tutti gli animali avviene la disseminazione ematogena al midollo.

guarigione e della possibilità di recidive in seguito alla terapia, appare tutt'altro che semplice. In questo senso la sierologia non può essere d'aiuto, dal momento che gli anticorpi di solito cominciano a declinare non prima di due mesi dopo la guarigione (clinica) e possono persistere anche fino a due anni dopo o per tutta la vita (Alvar *et al.*, 2004). In altre parole, la maggior parte dei metodi sierologici oggi disponibili, non può discriminare tra infezione attiva, passata od asintomatica (Prina *et al.*, 2007). La PCR offre un aiuto in più, anche se, al momento, non è possibile stabilirne completamente le potenzialità, soprattutto perché i *report* e le opinioni di esperti non sono affatto allineate. Secondo quanto riferito da Moreira e coll. (2007) a proposito della diagnosi a partire da campioni linfonodali, anche se la PCR (qualitativa) ha una sensibilità eccellente (pari al 100% nei soggetti sintomatici, al 96% negli oligosintomatici ed al 95,65% negli asintomatici), rivelerebbe solo la presenza del DNA parassitario e non quella di parassiti intatti ed inoltre non sarebbe in grado di discriminare, in base alla gravità, le varie forme dell'infezione. Analoga, come abbiamo già visto¹¹⁷, è la posizione di Xavier e coll. (2006). Viene riportato però che il DNA di *Leishmania* non sarebbe rilevabile trascorsi 6 o 21 giorni dalla morte dei parassiti (Alvar *et al.*, 2004). Esistono alcune segnalazioni in medicina umana secondo cui la negatività alla PCR corrisponderebbe alla cura parassitologica, mentre la positività alla presenza di parassiti vitali (Nuzum *et al.*, 1995; Cruz *et al.*, 2006). Disch e coll. (2004) hanno riferito che 16 su 17 pazienti (umani) con PCR su sangue periferico positiva (*target* DNA del cinetoplasto [kDNA]) prima della terapia, si sono negativizzati a partire dal 37° giorno di cura (AnM) e sono rimasti negativi per almeno 3 mesi dopo il trattamento. Per cercare di gettare una luce sull'annoso problema che la PCR possa rilevare DNA di parassiti non vitali, Prina e coll. (2007) hanno condotto una sperimentazione su macrofagi murini infetti da *L. amazonensis*, trattati con estere di L-leucina (molecola che uccide rapidamente gli amastigoti intracellulari): tramite PCR *real-time* è stato rilevato che, già un'ora dopo il trattamento, il DNA del cinetoplasto e del nucleo subiscono una diminuzione significativa, fino all'1% dei valori iniziali; la microscopia ha confermato un'analoga diminuzione degli amastigoti intracellulari, a partire da alcune ore dopo il trattamento, anche se una minima percentuale sopravvive e può, in opportune condizioni culturali, replicarsi ulteriormente. Comunque sia, è stato dimostrato sperimentalmente che la PCR rileva il

¹¹⁷ Si veda il paragrafo sull'importanza degli ospiti asintomatici (2.1.3).

DNA di parassiti intatti e che, in seguito alla morte degli amastigoti, il DNA nucleare ed il kDNA vanno incontro a rapida degradazione. In molti studi clinici (patologia umana) in cui la PCR è stata utilizzata per monitorare la presenza del parassita, il DNA resta rilevabile in tutti i soggetti curati ma che poi vanno incontro a recidiva; ci sono però anche individui, clinicamente guariti e con PCR negativa, che possono presentare ricadute, così come altri, PCR-positivi, che invece non sviluppano più i sintomi (Maurya *et al.*, 2005). Questi aspetti inducono a sottolineare l'importanza della sensibilità del metodo PCR utilizzato, così come la necessità di eseguire rilevazioni cinetiche (come quelle in tempo reale della PCR quantitativa *real-time*) e non solo *end point* (Prina *et al.*, 2007). Il vantaggio della PCR quantitativa (qPCR) rispetto alla PCR convenzionale è indubbio: Francino e coll. (2006) hanno sviluppato e testato un metodo basato su *TaqMan* con *target* a livello di DNA del cinetoplasto applicato su sangue periferico canino; l'ottima sensibilità del metodo permette di evidenziare da 0,001 a 10.000 parassiti per singola reazione, e questo può essere un valido aiuto nella decisione clinica, al momento della prima diagnosi, per la scelta se trattare o meno un soggetto asintomatico. Si potrebbe anche arrivare a suggerire numericamente il livello di DNA che discrimini tra semplice infezione e malattia; per esempio, gli autori hanno seguito due soggetti con qPCR positiva midollare nell'ordine di 60-80 parassiti/ml e non sottoposti a terapia; 6 mesi dopo, la carica parassitaria è scesa a meno di 1 parassita/ml: in questi casi dunque la qPCR rappresenta un valido metodo per decidere il ricorso alla terapia specifica, in quanto si può prevedere che i soggetti asintomatici ma con carica parassitaria elevata, possano andare incontro alla malattia conclamata e rappresentare un pericolo superiore come fonti di contagio. Mary e coll. (2006) hanno sviluppato una metodica qPCR (impiegata esclusivamente sulla frazione delle cellule nucleate del sangue), simile alla precedente, ma ancora più sensibile, arrivando a rilevare fino a 0,0001 parassiti (DNA equivalenti) per reazione; gli Autori hanno quindi stabilito quelli che secondo i loro risultati sono i valori soglia della parassitemia in soggetti umani asintomatici e sintomatici: nei primi, la parassitemia è sempre al di sotto di 1 parassita/ml, mentre nei secondi si parte da 8 parassiti/ml. Inoltre, cercando di spiegare ciò che emerge dall'impiego di una tecnica tanto sensibile, e cioè che nella maggior parte dei campioni ematici di soggetti asintomatici si rileva meno del DNA presente in una singola cellula di *Leishmania* (in 2 ml di sangue), gli Autori hanno ipotizzato che il DNA dei minicircoli rilevato, sia quello presente all'interno dei fagociti che hanno distrutto gli amastigoti e che non lo

hanno ancora idrolizzato; escludendo la provenienza plasmatica, in quanto il metodo di purificazione e lavaggio delle cellule nucleate (gradiente di Ficoll) elimina l'eventuale DNA presente.

Solitamente i *target* del genoma di *Leishmania* sono rappresentati dal DNA dei minicircoli del cinetoplasto (kDNA), dalla subunità piccola dell'rRNA (SSU-rRNA) e dal gene RNA SL (mini-esonico). Il kDNA è indubbiamente uno dei migliori bersagli, in quanto i minicircoli sono presenti in un numero altissimo di copie (nell'ordine di 10.000 per cellula) e contengono sia sequenze conservate tra le varie specie di *Leishmania*, che sequenze variabili (Gomes *et al.*, 2007). Nei campioni di sangue intero, o comunque in quelli che ne contengono (come può avvenire con quelli midollari), si può avere l'inibizione della PCR a causa di una mancata amplificazione; questo può dipendere dalla presenza residua di emoglobina. Il problema può comunque essere aggirato tramite la diluizione (100) o, chiaramente, scegliendo campioni privi di sangue come quelli cutanei, oppure tramite un'ottimizzazione dell'estrazione del DNA (Mathis e Deplazes, 1995; Fisa *et al.*, 2001; Lachaud *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2007). Per migliorare l'affidabilità e la sensibilità della tecnica, Gomes e coll. (2007) consigliano di processare i campioni entro 24 ore dal prelievo; in questo modo si eviterebbe qualsiasi rischio di inibizione della *Taq* polimerasi, in quanto in molti campioni biotici (sangue, urina, feci, liquido cerebrospinale) sono presenti dei componenti inibitori. In genere i ricercatori che eseguono test PCR, non giustificano la scelta dei protocolli di estrazione del DNA né quella dei *primer*; ma questi aspetti, soprattutto quando si ha a che fare con prove di campo che prevedono l'utilizzo di campioni difficili come il sangue intero (in cui l'eventuale DNA parassitario presente è in genere piuttosto diluito), possono avere un'importanza significativa sulla sensibilità del test stesso. È importante tenere presente il tipo di campione (perché la concentrazione del DNA parassitario e del soggetto è diversa), così come particolari condizioni cliniche del paziente (per es.: l'ematocrito quando si tratta di sangue intero) (Reithinger *et al.*, 2000). In un'applicazione di PCR qualitativa su biopsie midollari, utilizzando i *primer* SP176 e SP177 con *target* a livello del DNA dei minicircoli del cinetoplasto, Roura e coll. (1999) hanno ottenuto risultati notevoli quanto a sensibilità (97,8%¹¹⁸) e specificità (100%¹¹⁹), proponendo la metodica anche

¹¹⁸ 45 soggetti positivi su 46 confermati dalla dot-ELISA.

nel *follow-up* dei cani sottoposti a terapia, come ausilio nella difficile decisione dell'interruzione del trattamento stesso. Maia e coll. (2007) consigliano l'utilizzo della PCR a partire da aspirati linfonodali, sia per l'alta sensibilità che per la bassa invasività del metodo biotico, soprattutto in relazione alle biopsie spleniche (rischio di emorragie iatrogene), che pure godono di sensibilità superiore; non sempre comunque l'agoaspirazione linfonodale è percorribile, per esempio in assenza di linfadenomegalia; in tali casi è bene optare per la PCR su midollo osseo e, in via subordinata, per quella su sangue periferico. Anche secondo quanto riportato da Reale e coll. (1999) la PCR su biopsie linfonodali è molto affidabile, oltre che sensibile e specifica, in tutto il corso dell'infezione. Nella pratica clinica il possibile utilizzo di campioni poco invasivi è d'indubbia utilità. Strauss-Ayali e coll. (2004) hanno descritto un metodo per la PCR a partire da tamponi congiuntivali: vengono utilizzati tamponi di cotone sterili per batteriologia, applicati a materiale esfoliativo congiuntivale (congiuntiva palpebrale); questo metodo è risultato sensibile (92%), soprattutto se il prelievo viene effettuato da entrambi gli occhi, e specifico (100%). Sperimentalmente è risultato che nell'83% dei casi questa positività è precoce, rilevandosi già a partire dal 45° giorno post-infezione, prima della sierconversione. È interessante rilevare che solo il 17% dei soggetti i cui tamponi congiuntivali hanno dato questi ottimi risultati, avevano la PCR positiva su *buffy coat*. Considerando che i cani leishmaniotici hanno notevoli cariche parassitarie a livello cutaneo, a prescindere dalla presenza di lesioni specifiche, anche la PCR su campioni biotici cutanei del padiglione auricolare ha dato buoni risultati di sensibilità e specificità (Xavier *et al.*, 2006).

Negli ultimi tempi ha destato un certo interesse anche la possibilità di evidenziare il genoma di *Leishmania* in campioni d'urina, benché, per il momento, il metodo non possa essere utilizzato per la diagnosi primaria, in quanto non in tutti i soggetti infetti/malati l'urina risulta positiva alla PCR. Non è molto chiaro se il DNA (ed i parassiti interi) che è possibile evidenziare direttamente o indirettamente (tramite coltura) derivino dal sangue o da cellule macrofagiche delle basse vie urinarie, frequentemente interessate da episodi infiammatori di diversa intensità (Franceschi *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2007). Anche l'utilizzo della metodica come

¹¹⁹ 0 soggetti positivi su 41 cani sani.

monitoraggio di patologia renale appare controverso: benché Franceschi e coll. (2007) non abbiano riscontrato alcuna correlazione tra grado d'insufficienza renale e positività urinaria alla PCR, successivamente Solano-Gallego e coll. (2007) hanno evidenziato una correlazione tra carica parassitaria urinaria e BUN, creatininemia e rapporto proteine urinarie/creatinina urinaria, suggerendo anche una prognosi non favorevole nei soggetti interessati da tali alti valori.

Per quanto riguarda l'esecuzione della PCR su sangue periferico, conviene utilizzare il *buffy coat*¹²⁰ in considerazione della natura intracellulare del parassitismo di *Leishmania* (Lachaud *et al.*, 2001; 2002). Comunque i risultati che si ottengono col sangue canino appaiono in genere meno soddisfacenti rispetto ai risultati in campo umano (in pazienti affetti da leishmaniosi viscerale, la PCR su sangue periferico è quasi sempre positiva [Lachaud *et al.*, 2000]): questo dipende dalle conoscenze lacunose che si hanno a proposito della **parassitemia** nella specie canina, per quanto riguarda durata, costanza ed intensità (Lachaud *et al.*, 2002). Ottimizzando le metodiche di estrazione ed amplificazione, è possibile ottenere risultati fino a 10 volte più sensibili col *buffy coat* rispetto al sangue intero. Questo approccio appare utile nei casi di bassa parassitemia, come presumibilmente avviene nel cane, e come avviene nei pazienti umani coinfecti da HIV, soprattutto nelle recidive (Lachaud *et al.*, 2001).

¹²⁰ In seguito alla centrifugazione dei campioni di sangue intero, il *buffy coat* è il sottile strato giallo-grigiastro che separa il plasma soprastante dalla massa eritrocitaria sottostante, ed è costituito da WBC e piastrine.

5. ESAMI MICROSCOPICI CITOLOGICI

Gli esami microscopici citologici diretti su campioni biotici sono piuttosto facili da eseguire e, benché la loro sensibilità sia certamente inferiore ad altre tecniche dirette ed indirette, la specificità è massima, anche se dipende dalle capacità tecniche dell'operatore (Pizzirani e Saponetto, 1989[2]): alcuni pigmenti naturali come l'emosiderina od i precipitati dei coloranti, talvolta possono mimare degli amastigoti di *Leishmania*; il rischio di errori è maggiore quando i parassiti sono in numero esiguo. Ma la stretta aderenza ai criteri morfologici¹²¹ permette agevolmente di ottenere una specificità del 100%, mentre risultati falsamente positivi possono essere ottenuti sia con la sierologia che con la PCR; per cui la rilevazione degli amastigoti nei campioni citologici può essere considerata una metodica molto accurata per la diagnosi dell'infezione da *Leishmania*, sia nel cane che nell'uomo (Saridomichelakis *et al.*, 2005[2]). Citologicamente gli amastigoti possono essere osservati in sede intracitoplasmatica (macrofagi ed altri fagociti) od extracitoplasmatica (Paltrinieri *et al.*, 2007).

5.1. Citologia linfonodale

In genere risultano ben accessibili i linfonodi prescapolari e/o poplitei; il ricorso all'esame è imperativo in presenza di linfadenomegalia (Paltrinieri *et al.*, 2007), anche se la sensibilità non risulta correlata alla megalia linfonodale, bensì allo stato clinico (forme di malattia attive più gravi consentono una citologia linfonodale più frequentemente positiva); e questo vale anche per la citologia midollare¹²². In effetti, in assenza di linfadenomegalia, è più frequente ottenere dei campioni che contengono anche meno di 100 campi "ad immersione" (*Oil Immersion Fields* [OIFs]) e quindi dei vetrini praticamente inutilizzabili (Saridomichelakis *et al.*, 2005[2]). Per la classica tecnica dell'aspirazione ad ago sottile, possono essere utilizzate siringhe da 5-10 ml con aghi di 25-21G: mantenendo fermo il linfonodo con una mano, con l'altra s'introduce l'ago applicando una graduale aspirazione fino a circa 3/4 e muovendolo

¹²¹ Gli amastigoti di *Leishmania* appaiono rotondi od ovali, con diametro di 2-5 µm, un nucleo eccentrico, un cinetoplasto che assume una colorazione basofila più intensa del nucleo ed una membrana cellulare visibile.

¹²² Tale aspetto è in contrasto con quanto si verifica nella citologia linfonodale in corso di ehrlichiosi monocitica canina, che è più sensibile in presenza di linfadenomegalia periferica.

lateralmente, in avanti ed indietro; una volta effettuata l'aspirazione massima, prima di estrarre l'ago, si permette allo stantuffo di tornare, per pressione negativa, al punto di partenza. Piccole quantità di materiale linfonodale possono essere osservate nel cono della siringa o dell'ago; si disconnette l'ago, si aspira aria, si riconnette l'ago e si spruzza il materiale su uno o più vetrini portaoggetto e quindi si striscia tramite vetrino coprioggetto¹²³. Non occorre né la tricotomia né la preparazione chirurgica della cute. Una volta ottenuto lo striscio, può essere colorato col tradizionale metodo MGG (May-Grünwald-Giemsa) o con un metodo rapido basato sul Wright, come il Diff-Quick® (Pizzirani e Saponetto, 1989[2]; Cowell *et al.*, 2003). Non è frequente il ritrovamento di molte cellule macrofagiche infarcite di amastigoti, mentre di solito i parassiti vengono rilevati in sede extracellulare (per la rottura della membrana dei macrofagi) con molta pazienza ed attenzione (Pizzirani e Saponetto, 1989[2]). Prima di considerare un campione negativo, dovrebbero essere osservati 1.000 campi con obiettivo 100x (ad immersione, ovvero 1.000 OIFs) senza alcun riscontro parassitologico. In effetti nelle paucinfezioni, nei casi di malattia pregressa e/o già trattata, risulta piuttosto difficile, se non impossibile, evidenziare i parassiti, anche in presenza di un quadro istologico fortemente sospetto (Mancianti, 2001). Si può comunque iniziare con un'osservazione più limitata degli strisci linfonodali di 100 OIFs, per poi arrivare a 1.000 in caso di negatività; l'osservazione di così tanti campi microscopici richiede circa 60 minuti. Come è stato accennato, la sensibilità è significativamente più alta nei soggetti sintomatici rispetto agli asintomatici, sia per quanto riguarda l'osservazione di 100 OIFs (12,5% negli asintomatici, 83,8% nei sintomatici), che quella di 1.000 OIFs (25,8% negli asintomatici, 92,6% nei sintomatici)¹²⁴. Inoltre, anche se in genere la citologia linfonodale viene considerata meno sensibile di quella midollare, si possono anche avere risultati opposti, a causa dell'emodiluizione che può caratterizzare l'agoaspirazione del midollo osseo. È chiaro però che la sensibilità diagnostica generale aumenta abbinando le due tecniche, anche se è consigliabile iniziare dalla meno invasiva citologia linfonodale e ricorrere a quella

¹²³ Può essere eseguita anche la tecnica ad ago sottile (siringa 10 ml, ago 21G) senza aspirazione (Saridomichelakis *et al.*, 2005[2]): in questo caso la siringa è riempita d'aria già al momento dell'inserzione nel linfonodo, in modo da sfruttare l'azione capillare dell'aspirazione passiva. Dato che la siringa può essere impugnata verso la punta o anche a livello del cono dell'ago, l'operatore ha un controllo superiore nel direzionamento dell'ago stesso, che va effettuato solo in avanti ed indietro e velocemente (Cowell e Dorsey, 2002).

¹²⁴ Questo aspetto appare logico in considerazione del fatto che probabilmente il sistema immunitario dei cani asintomatici riesce a tenere sotto controllo, e quindi a livelli minimi, la carica parassitaria.

midollare in presenza di risultati non conclusivi (Saridomichelakis *et al.*, 2005[2]). Moreira e coll. (2007) riportano una sensibilità del 75,61% nei soggetti sintomatici, del 32% negli oligosintomatici e del 39,13% negli asintomatici, tutti valori significativamente inferiori rispetto ai corrispondenti risultati dell'immunocitochimica e della PCR. Secondo i risultati di Mylonakis e coll. (2005) la sensibilità risulta del 96,9% nei cani sintomatici (31 soggetti positivi su 32) e del 25% (6 su 24) in quelli con malattia subclinica.

L'evidenziazione di alterazioni citologiche compatibili con la leishmaniosi (flogosi linfoplasmacellulare e/o granulomatoso-piogranulomatoso, iperplasia linfonodale) deve spingere ad insistere nella ricerca degli amastigoti (Pizzirani e Saponetto, 1989[2]; Paltrinieri *et al.*, 2007). Il quadro iperplastico appare simile a quello normale, con una marcata predominanza di piccoli linfociti maturi (Cowell *et al.*, 2003). L'iperplasia linfoide può anche essere definita allorché si osservano, rispetto alla totalità delle cellule nucleate, più del 50% di piccoli linfociti, meno del 25% di medi e grandi linfociti e più del 5% di plasmacellule (Mylonakis *et al.*, 2005). Il quadro reattivo è simile ma si osserva la presenza anche di altri citotipi; più del 50% delle cellule nucleate è rappresentato da piccoli linfociti maturi, con una quantità da scarsa a moderata di prolinfociti, linfoblasti e plasmacellule (comprese le cellule di Mott che sono plasmacellule in cui le immunoglobuline, invece di essere secrete, restano in sede intracitoplasmatica formando degli accumuli vacuolari [corpi di Russell]). I linfonodi iperplastici/reattivi sono espressione di una proliferazione linfoide in risposta ad una stimolazione antigenica aspecifica che, se risulta particolarmente intensa, dà origine ad un quadro citologico di linfadenite. Se sono presenti 5 o più neutrofili per OIF, si parla di linfadenite neutrofilica; se sono presenti 3 o più eosinofili per OIF, si parla di linfadenite eosinofila; se sono presenti 3 o più plasmacellule per OIF, si parla di linfadenite con stimolazione immunitaria; se sono presenti 5 o più macrofagi per OIF, si parla di linfadenite istiocitaria o macrofagica o cronica. Il quadro prevalente può anche essere quello di una flogosi granulomatoso-piogranulomatoso, se sono presenti cellule giganti infiammatorie con eventuale componente purulenta (Cowell *et al.*, 2003).

In uno studio è stato rilevato che il 59,4% dei cani sintomatici (19 soggetti su 32) presenta un quadro citologico anormale, contro solo il 4,2% (1 su 24) dei soggetti

oligosintomatici, ma anche l'11,8% (2 su 17) dei soggetti negativi (controlli)¹²⁵. Nei soggetti sintomatici è stato osservato un aumento delle plasmacellule nel 53,1% dei casi (con cellule di Mott nel 15,6%), un aumento dei macrofagi nel 18,8% ed un aumento dei neutrofili nel 5,9% (1 solo caso su 32). Inoltre nei soggetti sintomatici non è stata osservata alcuna correlazione tra presenza e tipo di alterazione citologica e carica parassitaria (densità di amastigoti negli strisci linfonodali); negli stessi soggetti la linfadenomegalia è stata messa più frequentemente in relazione con il quadro citologico di iperplasia linfoide (68,7% dei soggetti: 22 su 32; gli altri 10 soggetti sono risultati con quadro citologico normale, nonostante la megalia linfonodale). Dunque nei cani sintomatici il quadro citologico prevalente è quello dell'iperplasia plasmacellulare, che può essere accompagnata dall'aumento dei macrofagi e dei neutrofili e può anche essere associato all'iperplasia dei piccoli linfociti. È piuttosto evidente però che la specificità dell'iperplasia plasmacellulare nella citologia linfonodale, come indicatore di leishmaniosi canina, è bassa, in quanto l'aumento di queste cellule può essere rilevato in qualsiasi patologia cronica caratterizzata dall'incremento della proliferazione delle cellule della serie B (stimolazione antigenica cronica) (Mylonakis *et al.*, 2005).

5.2. Citologia midollare

Secondo Paltrinieri e coll. (2007) la citologia midollare andrebbe eseguita in presenza di segni clinici od alterazioni clinico-patologiche riferibili ad un interessamento del midollo osseo (come in caso di anemia e trombocitopenia). I quadri citologici compatibili con la leishmaniosi sono rappresentati in genere dall'iperplasia mieloide e/o ipoplasia eritroide, anche se solitamente non si osservano variazioni degne di nota sul rapporto eritroide/mieloide, insieme con l'aumento delle plasmacellule, con il possibile riscontro, come per la citologia linfonodale, delle cellule di Mott; gli amastigoti in genere sono in sede extracellulare (Pizzirani e Saponetto, 1989[2]). Si può anche osservare una netta iperplasia macrofagica, che si rileva anche in diverse patologie sistemiche di natura virale, batterica o micotica (Harvey, 2001).

¹²⁵ A causa probabilmente di una stimolazione antigenica cronica che, nello studio in questione, non è stata indagata, pur nell'ipotesi di una forma parassitaria subclinica come la filariosi.

Dal punto di vista della metodologia operativa, è preferibile non ricorrere all'anestesia né alla sedazione, in quanto i rischi di queste pratiche sono superiori a quelli della stessa tecnica biotica (Harvey, 2001), anche se, in cani particolarmente esuberanti od indocili al contenimento, può essere opportuna la sedazione (tipo premedicazione chirurgica) (Pizzirani e Saponetto, 1989[2]). L'area cutanea interessata deve essere tricotomizzata e lavata con sapone antisettico, quindi si inietta dell'anestetico locale dalla cute fine al periostio (Harvey, 2001; secondo Pizzirani e Saponetto [1989[2]] l'iniezione periostale è quasi sempre inutile in quanto il dolore in seguito alla penetrazione dell'ago è minimo, assente nei cani adulti od anziani). L'ago da biopsia (18-16G) deve avere un mandrino rimovibile che va estratto solo in seguito alla penetrazione nella midollare dell'osso, in modo da evitare l'intasamento dell'ago stesso da parte dei detriti ossei (Harvey, 2001). Pizzirani e Saponetto (1989[2]) consigliano la sternomiocentesi, effettuata a livello della 2^a o 3^a sternebra, con il cane in decubito laterale e con l'arto anteriore flesso ed iperabdotto; in soggetti particolarmente grassi (evento raro nella leishmaniosi clinicamente manifesta) può essere difficile l'individuazione del punto di repere sternale, per cui si può optare per la superficie mediale dell'epifisi tibiale prossimale. In soggetti molto magri è agevole il prelievo dall'ala dell'ileo. Altre sedi che possono essere scelte, sono l'epifisi prossimale dell'omero e del femore. Una volta inserito l'ago nella cavità midollare, si estrae il mandrino e si connette l'ago ad una siringa (da 5, 10 o 20 ml). Secondo Pizzirani e Saponetto (1989[2]) l'aspirazione, che in alcuni soggetti può essere dolorosa, deve essere lenta fino ad ottenere 0,5-1 ml di materiale; secondo Harvey (2001) invece è opportuno applicare una vigorosa pressione negativa, tirando indietro lo stantuffo il più rapidamente possibile e, appena si osservano alcune gocce di materiale sanguinolento nella siringa, lo stantuffo è rilasciato e l'ago estratto. Se non è stato utilizzato alcun anticoagulante nella siringa, lo striscio va preparato entro pochi secondi, in quanto il midollo osseo coagula rapidamente; si possono utilizzare siringhe con diverse gocce di EDTA al 5% (oppure 0,2 ml di EDTA al 3% in soluzione fisiologica per una siringa da 10 ml [Saridomichelakis *et al.*, 2005]), in modo da guadagnare alcuni minuti: la preparazione dello striscio deve comunque essere veloce, perché le cellule midollari (soprattutto i neutrofili) tendono a degenerare in fretta (Harvey, 2001). Si depositano quindi 1-2 gocce di materiale midollare su un vetrino portaoggetti tenuto in posizione molto obliqua; il materiale sanguinolento tende a scivolare e lascia dietro di sé alcuni frustoli midollari che vanno strisciati

delicatamente o schiacciati con un vetrino coprioggetto. La fissazione e la colorazione sono quelle viste per la citologia linfonodale (Pizzirani e Saponetto, 1989[2]), tenendo presente che se il materiale strisciato è piuttosto spesso sono necessari tempi di colorazione più lunghi (Harvey, 2001) o, nel dubbio, il raddoppio degli stessi (Saridomichelakis *et al.*, 2005).

Come per la citologia linfonodale, anche quella midollare ha una sensibilità diagnostica significativamente superiore nei cani sintomatici rispetto agli asintomatici: rispettivamente 72,5% e 7,8% per 100 OIFs, 88,2% e 14,6% per 1.000 OIFs. Come accennato in precedenza, la sensibilità generale è comunque superiore abbinando le due tecniche citologiche (linfonodale e midollare): 93,1% nei sintomatici e 17,9% negli asintomatici per 100 OIFs, 94,7% nei sintomatici e 27,6% negli asintomatici per 1.000 OIFs. Per l'osservazione di 1.000 OIFs citologici midollari sono richiesti circa 45 minuti, contro i 60 di quelli linfonodali (Saridomichelakis *et al.*, 2005).

5.3. Citologia cutanea e dermica

È opportuno eseguire vetrini per impressione o raschiamento da ulcere o granulomi cutanei; talvolta si possono mettere in evidenza gli amastigoti anche in casi in cui la leishmaniosi non è stata sospettata e comunque questo tipo di citologia è utile anche in senso generale, per altri tipi di diagnosi (Pizzirani e Saponetto, 1989[2]). Anche se la presenza degli amastigoti di *Leishmania* permette inequivocabilmente di emettere la diagnosi d'infezione, non è detto che la lesione da cui è stato fatto il prelievo sia dovuta alla presenza dei parassiti, soprattutto quando non sono numerosi: infatti si può avere accumulo di cellule fagocitarie o anche la presenza di amastigoti in cellule non fagocitarie in lesioni cutanee di natura, per esempio, neoplastica (Albanese *et al.*, 2002; Ferroglio, 2007). L'impressione dermica può essere effettuata, previa iniezione di un anestetico locale, prelevando una piccola porzione cutanea (0,5 cm²), la cui parte inferiore deve essere schiacciata ripetutamente su un vetrino portaoggetto. Siccome il materiale che si ottiene è scarso e molto diluito, sono necessarie pazienza ed attenzione: solitamente i parassiti sono come unità singole ed isolate nell'intero campo microscopico. Con questa tecnica è possibile comunque mettere in evidenza gli amastigoti in soggetti infetti, anche in aree cutanee senza alcuna lesione macroscopicamente evidente (Pizzirani e Saponetto, 1989[2]).

5.4. Amastigoti nel sangue periferico

Nella leishmaniosi canina il rinvenimento di amastigoti nel sangue periferico è ritenuto un evento del tutto eccezionale, che occasionalmente si può verificare durante l'osservazione di strisci non mirati nella ricerca diretta del parassita (Domina e Catarsini, 1983; Domina *et al.*, 1987; Foglia Manzillo *et al.*, 2005). Per cui la sensibilità dell'esame parassitologico di strisci di sangue periferico è prossima allo zero (Abranches *et al.*, 1983), mentre risultati più consistenti si possono ottenere dall'isolamento in coltura e, soprattutto, dalla PCR su *buffy coat* (i metodi quantitativi forniscono delle sensibilità paragonabili a quelle di altri tessuti bioptici come i linfonodi ed il midollo osseo), come accennato in precedenza (Mathis e Deplazes, 1995; Lachaud *et al.*, 2001; 2002). Se da una parte l'isolamento in coltura permette la conferma indiretta della presenza degli amastigoti nel sangue, d'altra parte, allo stato attuale, non è possibile stabilire se la positività alla PCR corrisponde sempre ed invariabilmente alla presenza di amastigoti vitali circolanti¹²⁶ (Foglia Manzillo *et al.*, 2005): in uno studio, solo 4 campioni ematici su 18 con PCR *nested* positiva (su cellule mononucleate del sangue periferico [PBMC]), hanno permesso l'isolamento in coltura; questa discrepanza può essere dovuta alla presenza di una qualche forma d'inibizione nel sangue periferico o all'effettiva bassa parassitemia di amastigoti vitali (Fisa *et al.*, 2001)¹²⁷. In pazienti umani ospedalizzati, HIV-positivi e con leishmaniosi trattata una prima volta, è stato stimato che la probabilità di andare incontro a recidiva (molto più alta, in generale, rispetto ai soggetti HIV-negativi) a 2 anni dalla terapia, è del 76% per i soggetti con coltura positiva dal sangue periferico, mentre solo del 50% per quelli con PCR *nested* su PBMC positiva (Riera *et al.*, 2005). È evidente che nella leishmaniosi canina la parassitemia, ovvero la disseminazione ematogena del parassita, si può realizzare, in base alla rilevazione di amastigoti in moltissimi organi, tessuti e cellule dell'organismo (Foglia Manzillo *et al.*, 2005); tale disseminazione seguirebbe una sequenza, con gli organi abbondanti in cellule del sistema reticolo-

¹²⁶ Si veda quanto riportato in precedenza a proposito delle applicazioni pratiche della PCR (4.5).

¹²⁷ La semina in coltura del sangue intero, è in genere seguita dallo sviluppo dei parassiti meno frequentemente rispetto alla semina della sola frazione mononucleata: nel primo caso si possono sviluppare dei prodotti metabolici che interferiscono sullo sviluppo di *Leishmania*, soprattutto attraverso un meccanismo di diluizione della carica parassitaria; quindi sono necessarie diverse sottocolture e l'utilizzo di terreni arricchiti con sostanze nutritive, per permettere la moltiplicazione ed il mantenimento dei parassiti (de Freitas *et al.*, 2006).

istiocitario che vengono invasi prima della cute, ma questo processo non è ancora molto chiaro (de Fátima Madeira *et al.*, 2006). Anche la PCR su sangue periferico di animali infetti può essere negativa (Mancianti e Franceschi, 2006); questo probabilmente dipende dal fatto che il parassita inizialmente si localizza a livello del sito dermico d'infezione, con la disseminazione ematogena che si verifica (ammesso e non concesso che si verifichi sempre) dopo un periodo di tempo imprecisato (Reithinger *et al.*, 2000). È stato dimostrato che nell'infezione sperimentale del criceto da *L. braziliensis*, si può verificare una disseminazione viscerale a partire da un sito d'infezione dermico, così come una disseminazione dermica e viscerale a partire da un sito d'infezione viscerale (milza). In questo modo è stato postulato il possibile meccanismo attraverso il quale si sviluppa il quadro particolare della leishmaniosi (umana) dermica post-viscerale (PKADL: singole lesioni cutanee si possono sviluppare in pazienti che anni prima sono stati affetti dalla forma viscerale, curata ed apparentemente guarita) così come della devastante leishmaniosi mucocutanea, che si può presentare anche molti anni dopo una forma localizzata cutanea. È probabile che si verifichi un'iniziale disseminazione ematogena multiorganica, con i parassiti che restano in varie sedi in uno stato biologico quiescente, da cui si possono riattivare ed andare incontro a nuove disseminazioni ematogene, magari in conseguenza di un'immunodepressione¹²⁸; oppure semplicemente la parassitemia si verifica in una fase successiva all'infezione (anche di anni), in quanto le difese dell'organismo riescono inizialmente a controllare ed a tenere localizzata l'infezione (Almeida *et al.*, 1996). Comunque sia è ampiamente ammesso che nella leishmaniosi umana la parassitemia si può realizzare, anche se più spesso nelle forme viscerali che in quelle cutanee (Weigle e Saravia, 1997). Nei pazienti umani coinfecti da HIV e *Leishmania*, la parassitemia è più frequente (ed il rischio di recidive è più alto) rispetto ai soggetti HIV-negativi; tra l'altro, in questi casi, la sierologia è di scarsa utilità (bassa sensibilità) a causa della grave compromissione del sistema immunitario, per cui i metodi di diagnosi parassitologica (osservazione diretta di amastigoti nel sangue periferico e, soprattutto, colture, oltre ovviamente alla PCR) trovano maggiore applicabilità (Dereure *et al.*, 1998). In diverse occasioni è stata dimostrata la parassitemia anche in soggetti del tutto asintomatici, come possono essere i donatori di

¹²⁸ Secondo Pearson e coll. (2001) le colture da sangue periferico di pazienti immunocompetenti sono quasi sempre negative, mentre in pazienti coinfecti da HIV possono essere positive.

sangue nelle aree endemiche: si suppone che gli episodi di parassitemia d'intensità variabile siano la regola invece che l'eccezione nei portatori sani di *L. infantum* (le Fichoux *et al.*, 1999). Anche nella leishmaniosi canina la parassitemia è considerata episodica nei soggetti infetti, sia sintomatici che asintomatici (de Freitas *et al.*, 2006). In senso generale, attualmente la parassitemia viene considerata frequente nei casi di leishmaniosi umana viscerale indiana, dell'Africa orientale ed anche in quella mediterranea in caso di coinfezione con HIV; recentemente, l'applicazione di tecniche di **leucoconcentrazione**, ha permesso di evidenziare che anche pazienti pediatriche immunocompetenti, in area mediterranea, presentano la parassitemia in più della metà dei casi (Chemli *et al.*, 2006).

Circa 80 anni fa venne osservato che i parassiti comparivano nel sangue in seguito all'iniezione di antimoniali (Chopra e Das Gupta, 1928), e che una singola dose "stimolante" di Neostibosan[®] produceva un aumento transitorio degli amastigoti circolanti nel giro di 10 minuti (Napier e Das Gupta, 1930).

Tabella 11 - Rassegna bibliografica delle segnalazioni sulla parassitemia in specie diverse dal cane (strisci ematici o colture da sangue periferico).

Descrizione della segnalazione	Riferimento bibliografico
Dopo aver trovato diversi casi umani (India) con amastigoti ¹²⁹ nel sangue splenico, sia <i>intravitali</i> che <i>postmortem</i> , Donovan iniziò a rilevarli anche nel sangue periferico ottenuto da punture digitali, molto raramente e solo nei casi febbrili (39,5-40 °C).	Donovan, 1904
Strisci positivi in 2 pazienti indiani affetti da leishmaniosi viscerale terminale. Gli amastigoti erano nei neutrofili e nei monociti.	Christophers, 1904
Occasionale rinvenimento di amastigoti extracellulari in strisci del sedimento ematico previa centrifugazione frazionata (campioni da pazienti con leishmaniosi viscerale non trattata). Colture positive nel 90% dei casi quando siano soddisfatte le seguenti condizioni: prelievo di un'adeguata quantità di sangue (10 ml), rimozione della maggior parte di RBC e siero tramite centrifugazione, leishmaniosi viscerale non trattata.	Young e Van Sant, 1923
Leishmaniosi viscerale umana in India: strisci (strato spesso) positivi nel 67% dei pazienti.	Knowles e Das Gupta, 1924

¹²⁹ È la storia della scoperta del parassita come agente causale del kala-azar: inizialmente (1903), i cosiddetti "corpi di Donovan" (ovvero gli amastigoti), vennero ritenuti da Laveran e Mesnil (a cui Donovan aveva inviato i suoi strisci di sangue splenico) dei parassiti degli eritrociti e quindi chiamati *Piroplasma donovani*. Nello stesso tempo i microrganismi vennero rilevati anche da Leishman (1903) che li ritenne delle forme degenerate di tripanosomi.

Descrizione della segnalazione	Riferimento bibliografico
Leishmaniosi viscerale umana in India: parassitemia nel 98% dei pazienti.	Shortt <i>et al.</i> , 1927
Leishmaniosi viscerale in un caso indiano con lesioni cutanee ricorrenti: isolamento di <i>L. donovani</i> in coltura.	Brahmachari e Dutt, 1927
Leishmaniosi viscerale umana in Sudan (distretto di Fung): 320 strisci negativi da 35 casi; in alcuni di essi i prelievi vennero eseguiti sia la mattina che la sera ed anche per più giorni (in un caso per 14 giorni consecutivi). Nel distretto di Kapoeta invece, gli amastigoti - <i>fagocitati dai leucociti</i> - erano invariabilmente presenti nel sangue periferico.	Archibald e Mansour, 1937
Leishmaniosi viscerale umana in Sudan (distretto di Fung): solo 3 casi con strisci (strato sottile senza nessuna tecnica di concentrazione) positivi su oltre 300. Gli amastigoti erano scarsi e fagocitati da neutrofili o monociti. In precedenza, nella stessa area, erano stati rilevati 13 casi con strisci positivi su 15.	Henderson, 1937
Leishmaniosi viscerale umana in Cina: strisci positivi nel 39% dei pazienti.	Wang, 1937
Leishmaniosi viscerale umana in nord Africa: l'isolamento in coltura (agar-siero di Locke) era molto difficoltoso. Nel bacino del Mediterraneo solo in rari casi gli strisci erano positivi, al contrario delle colture (agar-sangue di Locke) che lo erano nel 90% dei casi.	Adler, 1940
Leishmaniosi viscerale umana nel Kenya settentrionale: colture (NNN) negative in 10 pazienti.	Cole <i>et al.</i> , 1942
Leishmaniosi viscerale umana in Kenya: numerosi strisci da 40 pazienti: solo in un'occasione un caso si rivelò positivo. Circa il 60% delle colture risultavano positive.	Manson-Bahr e Heisch, 1956
Leishmaniosi viscerale umana nell'Africa orientale: colture (NNN) positive in 7 casi su 21.	Manson-Bahr, 1959
Leishmaniosi viscerale umana in Sudan (provincia del Nilo): strisci (sia strato sottile che spesso) sempre negativi da 30 pazienti; i prelievi erano stati effettuati sia in periodi febbrili che afebrili.	Van Peenen e Reid, 1962
Leishmaniosi viscerale umana sperimentale in Kenya: colture (NNN) positive da 1 a 4 mesi prima dell'esordio dei sintomi.	Manson-Bahr <i>et al.</i> , 1963
Leishmaniosi viscerale umana in Sudan: 20 casi di malattia attiva. Parassitemia in 13 di essi (65%): 7 con strisci positivi, il resto con positività alla prova biologica (iniezione del sangue per via intraperitoneale nel criceto). Negli strisci (strato sottile) i WBC e gli amastigoti erano quasi sempre concentrati all'estremità sfumata; in 5 casi i parassiti erano nei neutrofili, in 2 nei monociti ed in un solo caso c'era più di un amastigote per cellula (3). Nessuna correlazione tra febbre e parassitemia, neanche tra durata della malattia e parassitemia. Correlazione non statisticamente significativa tra parassitemia e leucopenia. La parassitemia risultava presente nei campioni prelevati tra le 6:55 e le 18:00, ma i prelievi effettuati nelle ore notturne erano troppo pochi per permettere di stabilire una qualche correlazione tra presenza di parassiti nel sangue ed ora del giorno. Veniva anche suggerito che, in seguito alla terapia (sodio stibogluconato), la parassitemia non scompariva altrettanto rapidamente rispetto alla forma indiana.	Rohrs, 1964
Sudan: isolamento in coltura (NNN) dal 5,8% di 138 gechi. Strisci negativi da 8 di questi soggetti.	McMillan, 1965

Descrizione della segnalazione	Riferimento bibliografico
<i>L. amazonensis</i> in Venezuela: il sangue di 4 roditori selvatici (<i>Heteromys anomalus</i>) venne seminato in coltura (NNN), con risultato negativo, ed inoculato (0,5 ml) per via intraperitoneale in altrettanti criceti, con risultato positivo in 2 casi.	Torrealba <i>et al.</i> , 1972
Lucertole in Libano: strisci positivi nell'8% dei soggetti (16 su 200); le colture dal sangue di 14 soggetti con striscio negativo dettero colture (NNN) positive (entro 8-10 giorni).	Edeson e Himo, 1973
Isolamento in coltura (NNN) da un ratto a Baghdad (Iraq).	El-Adhami, 1976
<i>L. braziliensis</i> in Costa Rica: isolamento in coltura (NNN e terreno di Senekjie) da un roditore selvatico (<i>Heteromys dermarestianus</i>) su 43 esaminati.	Zeledón <i>et al.</i> , 1977
Isolamento in coltura dal sangue di 9 su 439 (2,1%) bradipi asintomatici (studio epidemiologico) a Panama (<i>L. braziliensis</i>).	Herrer e Christensen, 1980
Isolamento in coltura da un paziente affetto da leishmaniosi muco-cutanea americana (le biopsie cutanee avevano dato esito negativo).	Bowdre <i>et al.</i> , 1981
Leishmaniosi viscerale umana in Kenya: i vetrini (10 per ognuno dei 20 pazienti) vennero ottenuti, dopo aver applicato diversi metodi di frazionamento, tramite citocentrifugazione (Cytospin®) , colorati con Giemsa ed osservati per almeno 5 minuti. Parte del sangue venne seminato in un terreno misto (NNN + terreno <i>Drosophila</i> di Schneider) ed un'altra parte inoculato per via intracardiaca nel criceto. Dalla combinazione dei metodi, la parassitemia venne rilevata in 15 pazienti su 20 (75%). 10 casi con colture positive (9 dal <i>buffy coat</i> , 8 dalla frazione mononucleata). 6 casi con prova biologica positiva. 11 casi con strisci positivi: 3 su strato sottile, 3 su <i>buffy coat</i> , 5 nella frazione dei leucociti mononucleati, 1 dei polimorfonucleati, 4 nella frazione del plasma ricco di leucociti; gli amastigoti erano sempre nei monociti, anche nella frazione polimorfonucleata. Il livello della parassitemia era in correlazione con la carica parassitaria degli strisci splenici; la parassitemia era comunque sempre molto bassa: solo in un caso venne osservata più di una cellula parassitata.	Chulay <i>et al.</i> , 1985
Leishmaniosi cutanea murina sperimentale (<i>L. major</i> in topi BALB/c): negli strisci colorati con Giemsa, la parassitemia compariva a 3 settimane dall'infezione, in concomitanza con le prime lesioni cutanee. Ad 8 settimane dall'infezione, il 56% degli amastigoti era nei monociti ed il 39% nei neutrofili; generalmente le cellule contenevano da 1 a 3 parassiti, ma nelle fasi più avanzate era possibile rinvenire grandi monociti con 10 o più amastigoti.	Hill, 1986
Leishmaniosi muco-cutanea da <i>L. braziliensis</i> in Brasile: il sangue, prelevato da 21 pazienti con una singola lesione cutanea che durava da circa due mesi, venne leucocitoconcentrato tramite centrifugazione e seminato in colture che dettero esito negativo.	Cuba-Cuba <i>et al.</i> , 1986
Leishmaniosi cutanea americana (Brasile): colture di WBC negative da 60 pazienti.	Silveira <i>et al.</i> , 1989
Paziente con AIDS in Francia (Tolosa): striscio colorato con Giemsa con rari amastigoti intramonocitari. Lo striscio del <i>buffy coat</i> rivelò la presenza di molte cellule massicciamente parassitate (anche con più di 10 amastigoti).	Fillola <i>et al.</i> , 1992
Colture (NNN modificato) positive in 2 pazienti su 21 affetti da leishmaniosi cutanea cronica (<i>L. major</i> e <i>L. tropica</i>) in Libano (Beirut).	Nuwayri-Salti <i>et al.</i> , 1992

Descrizione della segnalazione	Riferimento bibliografico
Xenodiagnosi con <i>Ph. perniciosus</i> e 1,5 ml di sangue prelevato da un paziente con AIDS (<i>L. infantum</i> , Spagna).	Molina <i>et al.</i> , 1992
Isolamento in coltura (frazione leucocitaria, ottenuta con centrifugazione frazionata, nel terreno di Senekjie) di <i>L. braziliensis</i> da 2 pazienti su 23 con leishmaniosi muco-cutanea (Brasile).	Martinez <i>et al.</i> , 1992
Strisci positivi (amastigoti nei leucociti) in 8 pazienti su 15 (53%) con AIDS (Spagna).	Martínez <i>et al.</i> , 1993
Infezione sperimentale da <i>L. tropica</i> viscerotropa e da <i>L. major</i> : colture (terreno <i>Drosophila</i> di Schneider) positive da 6 criceti su 10 e da 5 topi BALB/c su 9 infettati per via sottocutanea. Striscio positivo da un paziente umano (reduce americano dell'Operazione Desert Storm) infetto da <i>L. tropica</i> viscerotropa (era stato l'unico soggetto il cui sangue fosse disponibile per l'osservazione diretta, su 8 con sintomi riferibili).	Grogl <i>et al.</i> , 1993
25 pazienti coinfecti <i>Leishmania</i> + HIV (Spagna): colture (NNN o terreno <i>Drosophila</i> di Schneider) da <i>buffy coat</i> positive in 17 soggetti (67%); parassitemia rilevata in un ulteriore soggetto tramite la xenodiagnosi. IFAT positivo solo nel 33% dei casi.	López-Vélez <i>et al.</i> , 1995
Campioni di sangue da 12 pazienti coinfecti (<i>Leishmania</i> + AIDS, Francia). Osservazione diretta previa leucocitoconcentrazione (emolisi e doppia citocentrifugazione) ed anche seminati in coltura (NNN): spiccata correlazione tra i risultati dei due metodi (33 campioni positivi e 66 negativi con entrambi, 17 campioni discordanti [5 positivi con la leucocitoconcentrazione e 12 con la coltura]).	Izri <i>et al.</i> , 1996
Leishmaniosi viscerale umana in India (probabilmente da <i>L. donovani</i> ¹³⁰). Strisci multipli dal sangue prelevato in diverse ore del giorno e della notte da 20 pazienti: 45,7% di parassitemia diurna (dalle 08:00 alle 17:00) contro il 66% di parassitemia serale/notturna (dalle 18:00 alle 07:00; differenza statisticamente significativa) con un picco intorno a mezzanotte. Mai più di 10 amastigoti per 1.000 OIFs, anche nei pazienti con le più alte cariche parassitarie midollari. La periodicità della parassitemia è probabilmente in relazione alle abitudini crepuscolari/notturne del vettore (<i>Ph. argentipes</i>), con un analogo picco d'attività intorno a mezzanotte.	Saran <i>et al.</i> , 1997
7 pazienti con AIDS con sospetta coinfezione da <i>Leishmania</i> (Francia): presenza di amastigoti nel citocentrifugato (tramite Cytospin®), liberi ed intracellulari. Il numero dei parassiti andava da 1 a 150 per pellet di 28 mm ² , più spesso nei neutrofili che nei monociti, benché in questi ultimi la media degli amastigoti presenti fosse superiore.	Petithory <i>et al.</i> , 1997
Colture (<i>buffy coat</i> in NNN) positive in 6 su 65 pazienti HIV-positivi ed in 2 su 30 HIV-negativi (Francia). Buona correlazione tra parassitemia ed amastigoti midollari (dagli stessi pazienti: 23 campioni ematici e 21 midollari positivi).	Dereure <i>et al.</i> , 1998
Bassa sensibilità degli strisci (Giemsa, 1.000x, almeno 20 minuti d'osservazione) in pazienti HIV-positivi con infezione da <i>Leishmania</i> subclinica (1 positivo su 13 [7,7%]) a differenza della forma sintomatica (10 positivi su 15 [66,7%]).	Delgado <i>et al.</i> , 1998

¹³⁰ Nello studio in questione non venne eseguita la diagnosi di specie, ma in genere l'agente eziologico è *L. donovani* o, meno frequentemente, ceppi viscerotropi di *L. tropica*.


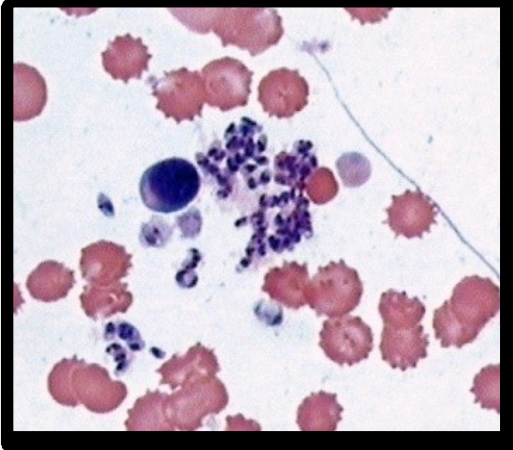
Descrizione della segnalazione	Riferimento bibliografico
Isolamento in coltura (NNN modificato) di <i>L. donovani</i> da una bambina di 9 anni con leishmaniosi cutanea (Beirut, Libano). Strisci negativi.	Nuwayri-Salti <i>et al.</i> , 1999
In uno <i>screening</i> di 12 mesi di 565 donazioni della Banca del Sangue di Monaco (Francia), vennero rilevati 9 donatori con parassitemia (<i>L. infantum</i>) tramite coltura (RPMI 1640): 6 casi coltivando 6 ml di <i>buffy coat</i> (corrispondenti a circa 60 ml di sangue) e 3 coltivando la frazione mononucleata (corrispondente a circa 10 ml di sangue). Fu necessario un lungo periodo d'incubazione (1-6 mesi). 9 campioni di sangue risultarono positivi alla PCR, ma in soli 2 casi si ottenne la positività sia alla coltura che alla PCR.	le Fichoux <i>et al.</i> , 1999
<i>L. donovani</i> in un villaggio indiano endemico (Gulmahiyaabagh, distretto di Patna Bihar). Strisci da 450 soggetti sani: 6 positivi (1,3%); tutti gli amastigoti erano in sede extracellulare e mai in numero superiore a 10 per 1.000 OIFs. In considerazione della scarsa sensibilità del metodo, gli Autori suppongono che il grado di parassitemia sia superiore di quello osservato.	Sharma <i>et al.</i> , 2000
Isolamento in coltura (NNN) da un bambino di 2 anni immunocompetente (<i>L. infantum</i> MON-24, Tunisia) con IFAT positivo 1/400 (soglia 1/100) e coltura midollare negativa. Il paziente era sintomatico da 6 mesi, trattato inadeguatamente; esito fatale nel giro di 24 ore dall'ospedalizzazione con un quadro di DIC imponente.	Belhadj <i>et al.</i> , 2000
La trasfusione di sangue intero, di plasma e della frazione mononucleata di criceti infettati sperimentalmente (<i>L. donovani</i>), trasmette l'infezione ad altri criceti.	Paraguai de Souza <i>et al.</i> , 2001
QBC ^{®131} : amastigoti nel sangue di 18 su 22 (81,8%) pazienti con leishmaniosi viscerale (Brasile).	Liarte <i>et al.</i> , 2001
Culture (NNN) da 61 pazienti con leishmaniosi viscerale (soprattutto bambini immunocompetenti) in Tunisia: sensibilità del 61%.	Belhadji <i>et al.</i> , 2002
Culture (terreno di Schneider modificato) da donatori spagnoli: 3 positive su 67 (4,5%; <i>L. infantum</i> MON-28) dal <i>buffy coat</i> (nessuna positività dalla frazione mononucleata).	Riera <i>et al.</i> , 2004
Pazienti ospedalizzati coinfecti da HIV e <i>L. infantum</i> (Barcellona, Spagna) trattati una prima volta per leishmaniosi (guarigione clinica): 14 soggetti su 20 andarono incontro a recidiva (da un mese a due anni dopo); durante le ricadute, le colture (terreno di Schneider modificato) da 21 su 24 campioni di sangue risultarono positive (23 su 24 PCR <i>nested</i> su PBMC) con una sensibilità dell'87,5% (95,8% per la PCR).	Riera <i>et al.</i> , 2005
Xenodiagnosi (<i>Lu. longipalpis</i>) da monociti di pazienti affetti da leishmaniosi cutanea (<i>L. braziliensis</i>), dopo la terapia (Colombia): 4 casi positivi su 23 testati (17,4%).	Vergel <i>et al.</i> , 2006

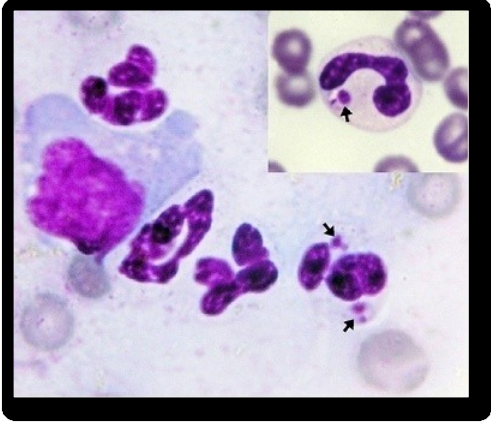
¹³¹ Il *Quantitative Buffy Coat*[®] è un metodo diagnostico originariamente utilizzato per la rilevazione del plasmodio della malaria nel sangue periferico; prevede l'impiego di *acridine orange* in provette da microematocrito: il colorante, specifico per il DNA, permette l'osservazione dei parassiti tramite un microscopio a luce UV.

Descrizione della segnalazione	Riferimento bibliografico
84 pazienti pediatrici (da 6 mesi a 10 anni d'età) immunocompetenti affetti da leishmaniosi viscerale mediterranea (Tunisia). Vetrini ottenuti con la leucoconcentrazione (Cytospin®) positivi in 47 soggetti (56%); il numero degli amastigoti andava da 1 a 64 per vetrino e nel 46% dei casi i parassiti erano nei neutrofili.	Chemli <i>et al.</i> , 2006
Isolamento in coltura (metodo microcolturale, <i>buffy coat</i>) da 16 pazienti umani (già riconosciuti parassitologicamente positivi) su 19 (84%) (risultati negativi dalla frazione mononucleata).	Hide <i>et al.</i> , 2007
Ricerca di <i>L. infantum</i> in 25 pazienti HIV-positivi (Tunisi, Tunisia): colture (NNN, <i>buffy coat</i>) negative ma positività ad una PCR qualitativa in 17 casi, senza altri <i>marker</i> dell'infezione da <i>Leishmania</i> (IFAT e <i>Western blotting</i>).	Kellel <i>et al.</i> , 2007
Rinvenimento di amastigoti intramonocitari ed extracellulari negli strisci di sangue di un lupo trovato morto in Croazia, con le lesioni tipiche della leishmaniosi canina.	Beck <i>et al.</i> , 2008

Tabella 12 - Rassegna bibliografica delle segnalazioni sulla parassitemia nel cane (strisci ematici o colture da sangue periferico).

Descrizione della segnalazione	Riferimento bibliografico
Rinvenimento di un singolo amastigote (<i>L. donovani</i>) in un neutrofilo nello striscio di un cane leishmaniotico.	Schalm, 1979
Nessuno striscio positivo su 23 cani leishmaniotici (Portogallo).	Abranches <i>et al.</i> , 1983
Reperti eccezionali di amastigoti in strisci di sangue periferico (nei neutrofili): 2 cani con malattia terminale.	Domina e Catarsini, 1983; Domina <i>et al.</i> , 1987
Leishmaniosi cutanea da <i>L. braziliensis</i> (Rio de Janeiro, Brasile): colture negative in 35 soggetti affetti.	Pirmez <i>et al.</i> , 1988
87 strisci (Giemsa; non tutti di soggetti diversi) in un'indagine epidemiologica in Portogallo (area metropolitana di Lisbona): tutti negativi.	Abranches <i>et al.</i> , 1991
Rinvenimento di un singolo amastigote in un monocito nello striscio di un cane leishmaniotico.	Ruiz De Gopegui e Espada, 1998
Infezione sperimentale di 6 Beagle da <i>L. infantum</i> : colture (NNN o terreno di Schneider) positive da 5 campioni su 35, prelevati prima della terapia.	Riera <i>et al.</i> , 1999
Sicilia: 36 strisci positivi su 42 (Giemsa, 1.000x, osservazione di almeno 100 campi) e 14 colture (terreno di Tobie modificato da Evans) positive su 38 da soggetti sintomatici.	Reale <i>et al.</i> , 1999
4 colture (frazione mononucleata, NNN) positive su 18 da soggetti leishmaniotici.	Fisa <i>et al.</i> , 2001
QBC®: amastigoti nel sangue di 28 su 28 soggetti con parassiti evidenziati con altri metodi diretti (26 sintomatici e 2 asintomatici).	Liarte <i>et al.</i> , 2001

Descrizione della segnalazione	Riferimento bibliografico
<p>Casuale rinvenimento di numerosi amastigoti (nei neutrofili [Figura 13] ed extracellulari [Figura 14]; <i>L. infantum</i>, Napoli) nello striscio di un Pinscher maschio di 11 anni. L'anamnesi riportava problemi gastrointestinali da un mese: disoressia, perdita di peso, diarrea ricorrente e distensione addominale postprandiale; all'esame fisico si apprezzava: scadimento fisico, depressione, disidratazione, mucose pallide e linfadenomegalia moderata. Esami di laboratorio: anemia normocromica normocitica iporigenerativa, leucocitosi con neutrofilia e linfopenia, aumento di ALP, γGT e BUN e gammopatia policlonale. ECO epatica: epatite acuta, colecistite cronica con piccoli calcoli biliari e colangioectasia. IFAT positivo 1/320 per <i>Leishmania</i> e 1/120 per <i>Ehrlichia canis</i>. Anche lo striscio da puntato midollare mostrava numerosi amastigoti in sede intramacrofagica ed extracellulare. Veniva iniziata la terapia con AnM (50 mg/kg SC BID per 10 giorni) e doxiciclina (10 mg/kg OS SID). Dopo 10 giorni: nessun miglioramento clinico, leucopenia con neutropenia, aumento della rigenerazione eritrocitaria e scomparsa degli amastigoti dallo striscio di sangue. Successivamente le condizioni cliniche peggiorarono progressivamente portando alla morte il soggetto a 20 giorni dall'inizio della terapia.</p>	<p>Foglia Manzillo <i>et al.</i>, 2005</p>
 <p>Figura 13 - 3 amastigoti in un neutrofilo nello striscio di sangue di un cane (MGG 100x) (Foglia Manzillo <i>et al.</i>, 2005).</p>	 <p>Figura 14 - Numerosi amastigoti extracellulari nello striscio di sangue di un cane (MGG 100x) (Foglia Manzillo <i>et al.</i>, 2005).</p>
<p>Strisci da soggetti sieropositivi sintomatici (34) ed asintomatici (17): tutti negativi (Brasile).</p>	<p>Soares <i>et al.</i>, 2005</p>
<p>19 soggetti adulti sieropositivi (di cui 16 contemporaneamente positivi all'IFAT, all'ELISA ed all'esame parassitologico del puntato midollare), di cui 6 asintomatici, 6 oligosintomatici e 7 sintomatici (Brasile): colture (NNN arricchito) positive in tutti i soggetti (nel 77% dei casi da sangue intero e nel 90% dalla frazione mononucleata); e prove biologiche (criceti infettati per via intraperitoneale, sia con sangue intero che con i soli monociti) positive in tutti i casi.</p>	<p>de Freitas <i>et al.</i>, 2006</p>

Descrizione della segnalazione	Riferimento bibliografico
<p>Occasionali amastigoti intraneutrofilici (Figura 15) nello striscio di un Boxer maschio di 8 mesi (il soggetto presentava poliartrite bilaterale posteriore [tarsi e metatarsi che apparivano rigonfi e doloranti] con conseguente zoppia [da 2 mesi], febbre [39,9 °C] e linfadenopatia generalizzata, oltre ad alcune alterazioni di laboratorio [moderata anemia normocromica normocitica non rigenerativa, trombocitopenia, leggeri aumenti di ALT e BUN, iperproteinemia con gammopatia policlonale e moderato incremento delle globuline α_2]). Amastigoti vennero ritrovati anche negli strisci linfonodali (nei macrofagi) ed in quelli sinoviali (nei macrofagi e nei neutrofili). Il soggetto rispose bene ad una terapia aggressiva con diversi farmaci (prednisone, AnM, amminosidina ed allopurinolo).</p>  <p>Figura 15 - Striscio di sangue periferico: neutrofili parassitati (Diff-Quik 1000x) (Santos <i>et al.</i>, 2006).</p>	<p>Santos <i>et al.</i>, 2006</p>
<p>Colture (NNN arricchito) dal sangue periferico di cani in un'indagine epidemiologica (Rio de Janeiro, Brasile): 13 su 39 soggetti positivi.</p>	<p>de Fátima Madeira <i>et al.</i>, 2006</p>
<p>Amastigoti nei neutrofili dello striscio da un cane gravemente malato (Brasile). Oltre alle condizioni fisiche molto scadenti, all'anoressia ed alla megalia dei linfonodi poplitei (puntato positivo), prima di sottoporre il soggetto ad eutanasia nell'ambito della campagna di controllo statale della leishmaniosi viscerale zoonosica, si rilevava anche: anemia gravissima (RBC $1,2 \times 10^6/\mu\text{l}$, PCV 9%), importante leucocitosi (WBC $29.600/\mu\text{l}$) con neutrofilia ($29.156/\mu\text{l}$) con la predominanza di neutrofili tossici, linfopenia (0) e monocitopenia ($296/\mu\text{l}$).</p>	<p>da Costa Vieira <i>et al.</i>, 2007</p>

6. PARTE SPERIMENTALE

6.1. Scopi

Lo scopo fondamentale della presente ricerca è stato quello di valutare un **metodo diretto di diagnosi parassitologica** della leishmaniosi canina, insieme alla stima della frequenza e dell'intensità della parassitemia, che fosse, allo stesso tempo, sufficientemente sensibile, affidabile, sicuro, semplice, poco invasivo¹³² e relativamente economico¹³³ (Chemli *et al.*, 2006). Altro obiettivo fondamentale è stato quello di individuare una possibile correlazione tra la presenza degli amastigoti nel sangue periferico e quella del DNA di *Leishmania*, rilevato tramite la tecnica della PCR.

La metodica si basa sulla ricerca microscopica degli amastigoti di *Leishmania* nel sangue periferico, previo trattamento dello stesso, che prevede l'emolisi degli eritrociti (e la piastrinolisi), la concentrazione della frazione cellulare nucleata su un monostrato sottile su di un vetrino portaoggetto (con la formazione di un *pellet* di 6 mm di diametro ed avente un'area di 28 mm²), tramite la **citocentrifugazione** (leucoconcentrazione o leucocitoconcentrazione), a cui segue una normale colorazione di tipo Romanowsky. La citoconcentrazione è d'importanza fondamentale, in quanto, come ampiamente illustrato in precedenza, l'osservazione diretta di normali strisci di sangue periferico, permette di evidenziare i parassiti in un numero estremamente esiguo di cani leishmaniotici, tale da rendere questo tipo di ricerca il risultato di ritrovamenti eccezionali ed occasionali e quindi del tutto inservibile dal punto di vista diagnostico. La leucoconcentrazione tramite citocentrifuga, offre l'indubbio vantaggio di poter osservare un grande numero di cellule ematiche (in particolare granulociti neutrofili e monociti, le uniche cellule del sangue periferico in cui sono stati osservati i parassiti sia nell'uomo che nel cane [Tabella 11, Tabella 12]) in tempi molto ridotti

¹³² È ovvio che, tra tutti i possibili metodi diagnostici, quelli che si basano sul prelievo del sangue periferico, sono i meno invasivi di tutti.

¹³³ L'economicità del metodo è in relazione al fatto che il laboratorio possieda già una citocentrifuga. In caso contrario, l'impegno economico per l'acquisto di questo strumento è certamente importante, per lo meno per strutture di piccole dimensioni: non meno di circa 8.000 € IVA esclusa per i modelli di ultima generazione. Recentemente è stato descritto un metodo fatto in casa per adattare allo scopo una normale centrifuga da banco (Sisino *et al.*, 2006).

rispetto ad altri metodi parassitologici (strisci da biopsie linfonodali, midollari, ecc.) (Fitzgerald e Hosking, 1982); inoltre consente anche la concentrazione di eventuali amastigoti presenti in sede extracellulare (Petithory *et al.*, 1997). Del resto, alcuni dei casi singoli segnalati in letteratura, riguardanti il rinvenimento di amastigoti nei normali strisci del sangue periferico canino, con descrizione dettagliata dei rilievi ematologici (Foglia Manzillo *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2006; da Costa Vieira *et al.*, 2007), permettono di stabilire una sorta di parallelismo tra il sangue dei soggetti in questione ed il trattamento a cui è stato sottoposto il sangue dei nostri casi prima dell'osservazione: si tratta infatti di soggetti con anemia più o meno grave (corrispondente all'emolisi del metodo in questione) e leucocitosi (in particolare neutrofilia), con la possibilità quindi di osservare un numero di globuli bianchi superiore rispetto ai casi senza leucocitosi o addirittura con leucopenia, come tramite la leucocitoconcentrazione. Non può essere escluso che la neutrofilia sia correlata alla parassitemia, anche se i casi descritti riguardano soggetti gravemente ammalati in cui può essere stata presente qualche tipo di coinfezione batterica con conseguente aumento dei neutrofili circolanti. Nel caso descritto da Foglia Manzillo e coll. (2005), il ritrovamento di amastigoti intraneutrofilici potrebbe essere in relazione anche alla coinfezione da *Ehrlichia canis*, benché non si abbiano dati certi sull'eventuale immunodepressione che può collegare le due patologie; è comunque altamente consigliabile operare un'attenta e meticolosa analisi dei normali strisci ematici, almeno in quei soggetti con questo tipo di coinfezione, oltre che in quelli che presentano una patologica diluizione degli eritrociti circolanti (anemia), soprattutto se accompagnata da leucocitosi neutrofila.

La pronta individuazione della parassitemia risulta anche di fondamentale importanza dal punto di vista **epidemiologico**, in quanto permette di identificare i soggetti che possono essere fonte d'infezione per i flebotomi, tramite un metodo molto meno laborioso ed invasivo, di quanto possano essere, per esempio, la xenodiagnosi o l'analisi di biopsie cutanee. Inoltre la parassitemia può certamente essere in relazione con la **trasmissione diretta** della leishmaniosi, come nel caso dello scambio di siringhe infette da parte dei tossicodipendenti, della trasmissione verticale e di quella trasfusionale. Per quanto riguarda quest'ultimo aspetto, è alquanto allarmante che, sia in ambito umano che canino, non ci sia alcun controllo preventivo routinario sul sangue dei donatori. È stato dimostrato che ceppi viscerotropi di *L. tropica*

sopravvivono alle normali condizioni di conservazione a cui viene sottoposto il sangue nelle banche trasfusionali: nel sangue intero, i parassiti resistono in sede intramonocitaria per 30 giorni a 4 °C e per almeno 5 giorni a 24 °C; nella frazione eritrocitaria sopravvivono, sempre nei monociti, per 25 giorni a 4 °C, per almeno 5 giorni a 24 °C nella frazione piastrinica e addirittura per almeno 35 giorni nella frazione eritrocitaria congelata con glicerolo; non solo *Leishmania* sopravvive, come dimostrato dalle colture positive, ma è anche in grado d'infectare sperimentalmente i topi da laboratorio sottoposti a trasfusione (Groggl *et al.*, 1993). In questo senso, è importante stabilire che il rischio sussiste per i donatori realmente parassitemici, cioè con amastigoti vitali nel sangue circolante: quanto recentemente riportato da Colomba e coll. (2005), che hanno escluso la parassitemia in 500 donatori umani in un'area endemica della Sicilia, sulla base della sola negatività sierologica (ELISA), appare quantomeno discutibile, come rilevato da Cardo (2006) in una lettera critica, in cui sottolinea il rischio di sottostimare la parassitemia tramite la sierologia, citando, in proposito, il lavoro di Riera e coll. (2004) su un gruppo di donatori in un'area endemica spagnola, con prevalenze del 2,4% per l'ELISA, del 4,5% per l'isolamento in coltura, del 7,6% per il *Western blotting* e del 22% per la PCR. Recentemente, in un'altra indagine sierologica eseguita in Sicilia sul sangue di 1.449 donatori umani, è emersa una positività all'IFAT in 11 casi (0,75%), di cui 4 positivi alla PCR (Scarlata *et al.*, 2008). In Spagna (Barcellona) la PCR *real-time* sul sangue di 92 donatori canini del tutto asintomatici (con analisi biochimiche ed emocromo nella norma e negativi ad un test sierologico ambulatoriale per *L. infantum* [Snap[®], IdexxTM], per *Ehrlichia canis*, *Dirofilaria immitis* e *Borrelia burgdorferi* [Snap 3[®]]) ha rilevato la presenza del DNA di *Leishmania* in 18 soggetti (19,6%), con valori di meno di 20 parassiti/ml in 13 casi, da 20 a 200 in 3 casi e da 200 a 2.000 in 2 casi (Tabar *et al.*, 2008).

6.2. Materiali e metodi

6.2.1. Citocentrifuga

È stata utilizzata la citocentrifuga Cytospin II[®] (Shandon[™], Pittsburgh, PA, USA; Figura 16) con i relativi accessori, ovvero i Cytofunnel[®] (le camere in plastica in cui depositare il campione), ciascuno unito ad una carta da filtro spessa con doppio foro ed al vetrino portaoggetto, il tutto assemblato tramite un Cytoclip[®] (una speciale molletta in acciaio inossidabile) (Figura 17, Figura 18).



Figura 16 - Citocentrifuga Cytospin II[®].



Figura 17 - Cytoclip[®] (sinistra) ed assemblato completo Cytoclip[®], carta da filtro, vetrino e Cytofunnel[®] (destra).

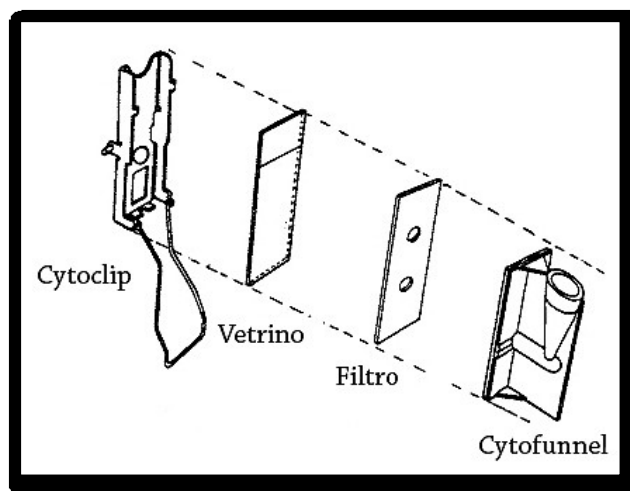


Figura 18 - Schema dell'assemblaggio dei componenti.

In senso generale, la citocentrifuga può essere utilizzata per trasferire qualsiasi particella sedimentabile da una sospensione liquida su un vetrino da microscopio, ma ovviamente viene usata principalmente per il trasferimento delle cellule presenti nei materiali biologici (liquido cerebrospinale, sinoviale, urina, agoaspirati biotici, sangue, fluidi di lavaggio broncoalveolare, ecc.). Prima dell'introduzione della citocentrifugazione, circa 45 anni fa, i metodi principali per trasferire le cellule erano: strisci diretti di sedimenti cellulari ottenuti tramite centrifugazione convenzionale, sedimentazione per gravità su vetrino e tecniche di raccolta con filtri. Non sempre comunque la citocentrifugazione si è rivelata superiore agli altri metodi, in quanto può avvenire che le cellule di piccole dimensioni vengano perse durante il procedimento; inoltre, in alcuni casi, il processo può determinare delle minime alterazioni morfologiche cellulari. Ma i progressi ed i perfezionamenti tecnici che sono stati raggiunti negli anni più recenti, hanno reso la tecnica come il metodo di riferimento per il trasferimento in citologia, offrendo il vantaggio di fornire campioni di ottima qualità senza richiedere un'esperienza approfondita. L'impiego della citocentrifugazione è in costante aumento nei laboratori di microbiologia ed ematologia, tant'è che il College of American Pathologists (CAP) ne raccomanda l'utilizzo in sostituzione degli strisci convenzionali (Stokes, 2004).

Semplificando, il principio della citocentrifugazione si basa sulla velocità di sedimentazione (dx/dt) delle particelle di una certa densità (dp), attraverso la densità di un mezzo fluido (dm) e sotto l'effetto delle forze d'attrito (proprie del mezzo e delle

particelle), quando una forza centrifuga (F) è applicata alla massa delle particelle (densità x volume [V]), secondo la seguente espressione:

$$dx/dt = \frac{(dp - dm)VF}{K}$$

Il termine $(dp - dm)$ rappresenta l'azione di galleggiamento del mezzo, che si oppone alla forza centrifuga diminuendo la massa effettiva delle particelle. Il termine forza centrifuga relativa (FCR), quando il raggio (r) è in mm, è espresso in gravità come il termine comune che si riferisce alle rivoluzioni per minuto (RPM) del rotore:

$$FCR (gravità) = 1,118r \left[\frac{RPM}{1000} \right]^2$$

La velocità di sedimentazione delle particelle, ovvero delle cellule, aumenta con la velocità di rotazione della centrifuga, ed è superiore per le particelle più grandi o più dense ed inferiore per quelle più piccole o più leggere (id).

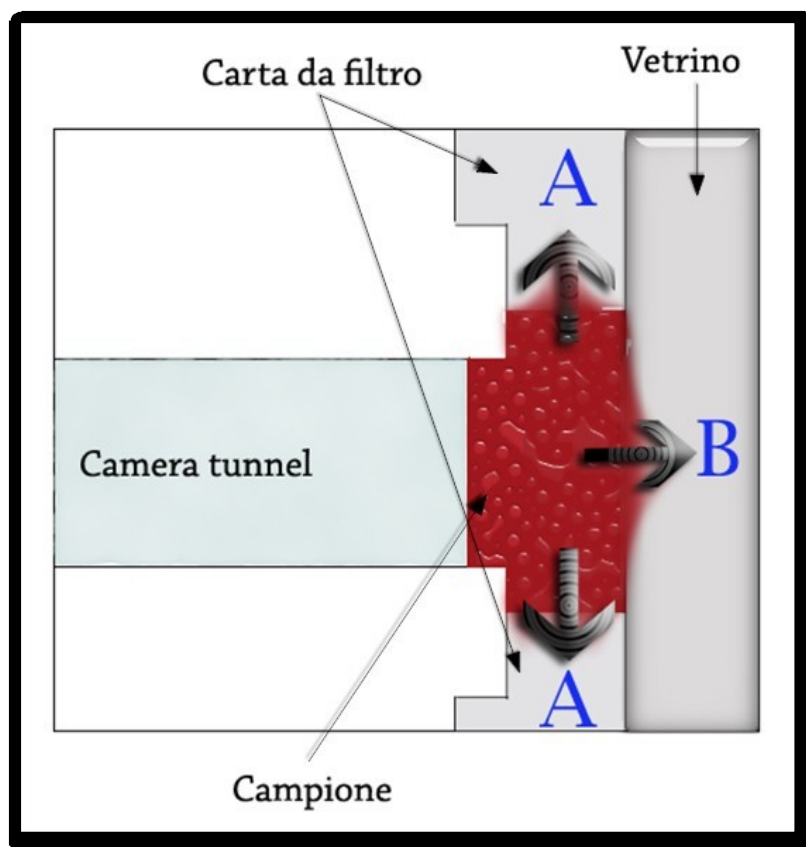


Figura 19 - Schema della sezione trasversale della camera della citocentrifuga. Il campione è in contatto con il vetrino da microscopio e la carta da filtro. Le frecce A rappresentano la forza idraulica che tende a spingere le cellule nel mezzo assorbente. La freccia B rappresenta la forza centrifuga che determina la sedimentazione delle cellule sul vetrino (da Stokes, 2004, modificato).

Nel Cytospin® la carta da filtro ha lo scopo di rimuovere la parte liquida del campione, costituita, nel nostro caso, dal plasma con i residui eritrocitari e piastrinici derivanti dall'emolisi a cui è stato precedentemente sottoposto il sangue intero (Figura 19). L'assorbimento, ovvero la rimozione della parte liquida, e la sedimentazione della parte cellulare, avvengono simultaneamente; per questo entrano in causa anche le forze idrauliche complesse che agiscono sulle cellule, e sono determinate dal flusso della sospensione fluida dall'area del campione. Queste forze sono massime ai bordi dell'area del campione e minime al centro e risultano variare nell'ambito dello stesso giro e tra giri. Possono determinare un certo grado di perdita delle cellule che vengono spinte nel mezzo assorbente, insieme alla parte liquida, prima che riescano a sedimentare sul vetrino; comunque, ottimizzando la scelta dei parametri della citocentrifuga (velocità, accelerazione e tempi) e del volume del campione, questo fenomeno può essere ridotto al minimo, tanto da poter essere ritenuto ininfluenza sulla bontà del procedimento (id)¹³⁴. È comunque possibile che un numero maggiore di leucociti sedimenti ai margini dell'area del citocentrifugato, senza che questo rappresenti un problema (Petithory *et al.*, 1997).

Nell'ambito della diagnosi diretta delle emoparassitosi in medicina umana, la citocentrifugazione tramite Cytospin® può essere utilizzata con successo per la rilevazione del plasmodio della malaria, degli amastigoti di *Leishmania*, delle microfilarie, dei tripanosomi e dei leucociti in cui possono essere presenti i parassiti o particolari pigmenti (Zaman e Yap, 1972; Petithory *et al.*, 1997; Chemli *et al.*, 2006).

6.2.2. Soggetti ed esami diagnostici

Nello studio sono stati inclusi soggetti positivi (con qualsiasi metodo diagnostico) chiaramente sintomatici, anche se con pochi segni clinici evidenti (oligosintomatici) e non precedentemente trattati (Chemli *et al.*, 2006). Non sempre questi assunti sono stati rispettati, ma abbiamo scelto di eseguire la citocentrifugazione anche in soggetti con diagnosi non certa o sicuramente negativa nell'ambito della valutazione generale del metodo. I cani - 23 soggetti di vari razze, età e sesso - sono stati riferiti da alcuni veterinari toscani, tutti operanti in zone più o meno endemiche,

¹³⁴ La conformazione particolare della carta da filtro, molto compressa, interviene nel ridurre ulteriormente questa dispersione, non permettendo un assorbimento troppo rapido.

nei primi 5 mesi del 2002. In particolare la provenienza dei soggetti è stata da un'area tirrenica della parte più a sud della provincia di Livorno (Venturina), dalla parte costiera della provincia di Lucca (Viareggio), dalla zona pisana e da due aree della provincia di Pisa delimitate ad est da Cecina (LI) e ad ovest da Volterra (PI). In diversi casi, oltre al sangue venoso intero, raccolto in provette da 2,5-3 ml con EDTA o sodio-citrato come anticoagulanti (per la citocentrifugazione e la PCR), è stato raccolto il siero per la diagnosi sierologica ed è stato eseguito l'agoaspirato linfonodale per la diagnosi citologica.

Nelle tabelle seguenti sono riassunte le caratteristiche dei soggetti (segnalamento ed anamnesi [Tabella 13]; sintomi e segni clinico-patologici [Tabella 14]) e degli esami effettuati (Tabella 15). I singoli cani sono indicati con una sigla ottenuta dal numero progressivo, dalle lettere iniziali del cognome del veterinario referente, del proprietario e dalle prime due lettere (la prima in maiuscolo e la seconda in minuscolo) del nome del soggetto (Nn = nessun nome fornito).

Tabella 13 - Soggetti originariamente inseriti nello studio: segnalamento ed anamnesi (ambientale).

Soggetto	Razza	Sesso	Età ¹³⁵	Anamnesi	Note
1GPJa	Meticcio	M	6	Campagna.	Mantello roano. Peso 42 Kg.
2GMRi	Segugio Maremmano	M	2,5	Campagna.	Mantello tigrato. Peso 15 Kg.
3CTNn	Segugio	F	1	Zona endemica dell'entroterra collinare pisano. Già positivo, leggero aggravamento.	Mantello roano. Peso 20 Kg.
4VVTh	Labrador Retriever	F	3	Asintomatico. In passato ha convissuto con soggetto positivo e sintomatico.	
5GCAr	Pointer	F	13	(LI)	Mantello bianco-arancio. Peso 18 Kg.
6PPPi	Setter Inglese	M	4	Campagna, collina (265 m slm), zona altamente endemica.	Mantello bianco-nero. Peso 20 Kg.
7PPRo	Meticcio	M	8	Campagna, collina (265 m slm), zona altamente endemica.	Nero focato. Peso 15 Kg.

¹³⁵ Anni.

Soggetto	Razza	Sesso	Età ¹³⁵	Anamnesi	Note
8SNBe	Meticcio	F	4	Sottoposto a terapia specifica 1 anno prima.	
9SNBi	Meticcio	M	4	(LI)	
10SFNn	Setter Inglese	F	2	In terapia specifica.	
11NPNn	Spinone Italiano	M	5	(LU)	
12SFNn	Meticcio	M	5	(PI)	
13CSTo	Collie	M	5	Zona endemica dell'entroterra collinare pisano.	
14CSOt	Meticcio	M	5	Zona endemica dell'entroterra collinare pisano.	
15CPNn	Rottweiler	M	3	Zona endemica (FI).	
16GCBi	Meticcio	F	5	(LI)	Mantello tricolore. Peso 8 Kg.
17NBNn	Springer Spaniel	M	5	(SP)	
18GLRo	Meticcio	M	3	(LI)	Mantello fulvo. Peso 17 Kg.
19GLZo	Meticcio	F	3	(LI)	Mantello fulvo. Peso 16 Kg.
20GMLi	Springer Spaniel	F	2,5	Campagna.	Mantello bianco-fegato.
21MADi	Meticcio	F	4	Alta collina. Ricaduta, positivo e sintomatico, trattato 2 anni prima.	
22CDNn	Spinone Italiano	M	7	(PI)	
23CSNn	Meticcio	M	5	(PI)	

Tabella 14 - Soggetti originariamente inseriti nello studio: sintomi, segni clinici e rilievi aspecifici di laboratorio (sono omessi i soggetti di cui non sono pervenuti i dati).

Soggetto	Sintomi, segni clinici e rilievi aspecifici di laboratorio
1GPJa	Linfoadenopatia, lesioni cutanee (dermatite furfuracea, ulcerazioni, occhiali, alopecia diffusa), letargia, splenomegalia.
2GMRi	Linfoadenopatia, lesioni cutanee (dermatite furfuracea, ulcerazioni), dimagrimento, letargia, anoressia.

Soggetto	Sintomi, segni clinici e rilievi aspecifici di laboratorio
3CTNn	Linfoadenopatia, lesioni cutanee (occhiali, noduli non ulcerati), dimagrimento, splenomegalia.
4VVTh	Asintomatico.
5GCAr	Linfoadenopatia, lesioni cutanee (dermatite furfuracea).
6PPPi	Linfoadenopatia, lesioni cutanee (ulcerazioni), mucose pallide, dimagrimento, ipotrofia muscolare, congiuntivite.
7PPRo	Linfoadenopatia (poplitei), lesioni cutanee (ulcerazioni), mucose pallide, letargia, congiuntivite, diarrea.
10SFNn	Sintomatico.
13CSTo	Asintomatico.
14CSOt	Linfoadenopatia.
15CPNn	Linfoadenopatia.
16GCBi	Lesioni cutanee (ulcerazioni).
17NBNn	Linfoadenopatia, splenomegalia.
18GLRo	Linfoadenopatia, lesioni cutanee (dermatite furfuracea, occhiali, alopecia diffusa, onicogrifosi), dimagrimento, ipotrofia muscolare, splenomegalia.
19GLZo	Linfoadenopatia, lesioni cutanee (dermatite furfuracea, occhiali, ipercheratosi nasale/digitale), dimagrimento, ipotrofia muscolare, epistassi.
20GMLi	Linfoadenopatia, lesioni cutanee (occhiali), congiuntivite.
21MADi	Linfoadenopatia, lesioni cutanee (ulcerazioni, alopecia diffusa, onicogrifosi), letargia, polidipsia, congiuntivite. Elettroforesi: picco β e γ ; Prot. tot. 8,3 g/dl (6 - 7,5).
22CDNn	Linfoadenopatia.

Tabella 15 - Soggetti originariamente inseriti nello studio: esami effettuati.

Soggetto	Test rapido	FNA Inf ¹³⁶	Coltura	IFAT	PCR	Cytospin®
1GPJa				X	X	X
2GMRi				X	X	X
3CTNn		X		X	X	X
4VVTh				X	X	X
5GCAr				X	X	X
6PPPi	X				X	X
7PPRo	X			X	X	X

¹³⁶ Agoaspirato linfonodale.

Soggetto	Test rapido	FNA Inf ¹³⁶	Coltura	IFAT	PCR	Cytospin®
8SNBe		X		X	X	X
9SNBi				X	X	X
10SFNn		X		X	X	X
11NPNn		X		X	X	X
12SFNn		X	X	X	X	X
13CSTo				X	X	X
14CSOt			X	X	X	X
15CPNn		X		X	X	X
16GCBi				X	X	X
17NBNn				X	X	X
18GLRo		X		X	X	X
19GLZo		X		X	X	X
20GMLi				X	X	X
21MADi		X		X	X	X
22CDNn				X	X	X
23CSNn		X		X	X	X

6.2.3. Protocollo della citocentrifugazione

È stato applicato il protocollo descritto da Petithory e coll. (1997) e da Chemli e coll. (2006). La soluzione emolizzante è stata preparata in una fiala graduata da 100 ml in cui sono stati mescolati 30-40 ml di soluzione fisiologica con 0,4 g di saponina, 1,5 ml di formalina tamponata, 0,1 g di thimerosal e 0,1 ml di Tween 20. Il volume è quindi stato aggiustato a 100 ml sempre con fisiologica. La soluzione è stata filtrata attraverso un filtro da 0,22 µm per eliminare i lieviti ed i batteri che frequentemente contaminano la polvere di saponina. Questa miscela può essere conservata a temperatura ambiente fino a due anni.

Inizialmente, per ogni campione di sangue, sono stati eseguiti almeno 2 citocentrifugati: uno dal sangue intero ben omogeneizzato ed uno dal *buffy coat*. Nel primo caso, il volume del campione di partenza è stato di 500 µl, nel secondo, di 300

μl . In considerazione dei migliori risultati a partire dal *buffy coat* (maggiore cellularità, numero minore di RBC, loro residui e piastrine¹³⁷), per i campioni successivi ai primi 5-6, è stata utilizzata unicamente questa frazione e non il sangue intero. L'impiego della frazione leucocitaria ha anche lo scopo di aggirare in parte la limitazione di non disporre sempre dei risultati dell'esame emocromocitometrico, che permetterebbero di scegliere volumi ottimali di sangue intero emolizzato, in funzione del numero di leucociti per μl ¹³⁸. Il campione di partenza, prelevato tramite pipettrice, è stato accuratamente miscelato con la soluzione emolizzante (in proporzione 1:2 [1 ml nel caso del sangue intero, 600 μl nel caso del *buffy coat*]); l'emolisi appare evidente nel giro di 1 minuto. 300 μl della miscela così ottenuta sono stati pipettati nella camera del Cytotunnel[®] (con l'apparato precedentemente montato¹³⁹), e l'assemblato completo è stato inserito nel Cytospin[®]. È stata avviata la citocentrifugazione, impostando la macchina a 2.000 rpm (447 x g) con un'alta accelerazione, per 12 minuti. I vetrini così ottenuti sono stati lasciati asciugare all'aria (in considerazione delle minute dimensioni del monostrato cellulare ottenuto [*pellet* di 6 mm di diametro avente l'area di 28 mm²], l'asciugatura è completa in pochi minuti), quindi fissati e colorati. Per i primi campioni è stato utilizzato il classico metodo di May-Grünwald per la fissazione/colorazione (3 minuti + acqua distillata per 5 minuti) e quello di Giemsa per la colorazione (30 minuti). Successivamente è stato utilizzato il più performante metodo di Parrot-Lestoquard:

- Fissazione:
 - Si ricopre il vetrino con sublimato alcoolico di Schaudin, lasciandolo agire per 10';

¹³⁷ Una certa percentuale di RBC resta nonostante l'emolisi preventiva.

¹³⁸ Petithory e coll. (1997) e Chemli e coll. (2006) riportano i seguenti aggiustamenti per il volume di sangue emolizzato (campioni umani) in funzione del numero di WBC/ μl :

WBC/ μl	Volume sangue emolizzato (μl)
1.000 - 3.000	400 - 500
3.000 - 4.000	350
5.000 - 6.000	300
9.000 - 12.000	200
> 12.000	150

¹³⁹ Figura 18.

- Si elimina l'eccesso e si ricopre con alcool iodato che va rinnovato finché non si colora più;
- Si eliminano le tracce di iodio con alcool a 95°;
- Asciugatura;
- Colorazione:
 - Si ricopre il vetrino con siero di cavallo o di bovino per 10';
 - Si asciuga rapidamente con carta bibula;
 - Si colora con Giemsa diluito 1/10 per 1 ora;
 - Si lava e si asciuga.

L'osservazione microscopica dei vetrini così ottenuti è stata eseguita a 1.000x ad immersione.

6.2.4. PCR

6.2.4.1. Estrazione

L'estrazione del DNA genomico dai campioni di sangue, è stata eseguita utilizzando il kit Wizard[®] Genomics DNA Purification (Promega[™], Madison, WI, USA), secondo le istruzioni del produttore. In breve, 300 µl di sangue sono stati miscelati in provetta con 900 µl di soluzione lisante cellulare, lasciandola agire per 10'. È stata quindi eseguita una centrifugazione a 15.000 rpm per 20'' con successiva eliminazione del surnatante. Nella provetta è stata aggiunta la soluzione lisante nucleare (50 µl) e poi quella precipitante le proteine (50 µl). Quindi è stata eseguita un'altra centrifugazione (15.000 rpm per 3') con successivo prelevamento del surnatante che è stato miscelato ad isopropanolo¹⁴⁰ (300 µl) in un'altra provetta. Si è proceduto ad effettuare un'ulteriore centrifugazione (15.000 rpm per 1') con successiva eliminazione del surnatante, quindi un lavaggio con etanolo (300 µl) del DNA sedimentato a cui è seguita un'ultima centrifugazione (15.000 rpm per 1'). Dopo eliminazione del surnatante, la provetta è stata capovolta all'aria, per permettere

¹⁴⁰ Permette di evidenziare il DNA, che appare sotto forma di flocculazioni evanescenti.

l'asciugatura e l'eliminazione del liquido di lavaggio. Dopo l'aggiunta di 60 µl di soluzione reidratante, la provetta è stata posta a refrigerare (4 °C) fino al giorno successivo.

6.2.4.2. Amplificazione

Per l'amplificazione è stato utilizzato il metodo **PCR nested**, che in generale è caratterizzato da sensibilità e specificità superiori rispetto alla PCR convenzionale, in quanto vengono impiegati due set di *primer*: il primo per una normale amplificazione, il secondo (*nested primers*) per un'ulteriore amplificazione dei prodotti della prima reazione come *target*, il cui prodotto ha dimensioni ridotte rispetto alla prima amplificazione. Chiaramente, a fronte di risultati più affidabili, si ha un allungamento dei tempi operativi ed una maggiore difficoltà tecnica rispetto alla PCR convenzionale (Fisa *et al.*, 2001; Viljoen *et al.*, 2005).

Sono state approntate due *master mix* (le miscele dei reagenti per l'amplificazione), una per ciascuna delle due PCR, caratterizzate dalla stessa composizione, con l'esclusione dei due set di *primer* diversi: all'acqua deionizzata sterile sono stati aggiunti, in successione, il *buffer* 10x, MgCl₂, i 4 trifosfati desossinucleotidici (dNTP: dATP, dCTP, dGTP e dTTP) in uguale concentrazione, i *primer* (diluiti 1:1) - R221 (GGTTCCTTTCCTGATTACG)¹⁴¹ e R332 (GGCCGGTAAAGGCCGAATAG)¹⁴² per la prima reazione, R223 (TCCCATCGCAACCTCGGTT)¹⁴³ e R333 (AAAGCGGGCGCGGTGCTG)¹⁴³ per la seconda reazione - e la *Taq* polimerasi. Per la prima reazione, la relativa *master mix* è stata suddivisa in parti uguali ed aggiunta ad ognuno dei campioni di DNA genomico estratti in precedenza (in proporzione 4:1); nella reazione sono stati inclusi anche un controllo positivo ed uno negativo. Le provette così ottenute sono state inserite nel termociclatore (MyCycler™, Bio-Rad™, Hercules, California, USA) impostato nel modo seguente: 94 °C per 5'; 35 cicli di 94 °C per 30" (denaturazione¹⁴⁴), 60 °C per 30" (*annealing*¹⁴⁵) e 72 °C per 30" (sintesi o estensione); 72 °C per 10' (ulteriore

¹⁴¹ Specifico per i protozoi dell'ordine *Kinetoplastida* (van Eys *et al.*, 1992).

¹⁴² Specifico per *Leishmania* e *Crithidia* (id).

¹⁴³ Specifico per *Leishmania* (id).

¹⁴⁴ Separazione della doppia elica del DNA.

¹⁴⁵ Appaiamento dei *primer* alle sequenze complementari delle due eliche del DNA.

estensione). I prodotti di questa prima PCR, miscelati alle aliquote della seconda *master mix*, sono stati sottoposti alla seconda reazione, identica alla precedente.

6.2.4.3. Elettroforesi

I prodotti della seconda reazione sono stati quindi sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio, preparato a partire dalla relativa polvere, alla concentrazione dell'1% con tampone TAE (0,5 g di polvere + 50 ml di tampone), riscaldati nel fornello a microonde per ottenere la perfetta omogeneizzazione della parte solida con quella liquida (avendo cura di non raggiungere l'ebollizione). Previo raffreddamento parziale del gel, è stato aggiunto il colorante bromuro di etidio (alla concentrazione di 0,5 µl/ml) sotto cappa chimica (per la tossicità della sostanza che si lega al DNA). La soluzione è stata quindi versata nell'apposita vaschetta che, dopo solidificazione del gel, è stata inserita nella camera elettroforetica. Con l'apposito pettine sono stati praticati i pozzetti nel gel, e quindi, ai due estremi, è stato inserito un *ladder*, che è formato da frammenti nucleotidici di dimensione nota e serve da riferimento e per stabilire il limite laterale della migrazione elettroforetica. Nei pozzetti sono stati inseriti 23 µl di ciascun prodotto della seconda PCR, previa aggiunta di 2 µl di blu di bromofenolo (colorante che rende evidente la migrazione). È stato quindi avviato l'alimentatore impostato a 100 volt per 1' e ad 80 volt per 30'. Il gel è quindi stato osservato alla luce ultravioletta per evidenziare la migrazione elettroforetica e quindi stabilire l'eventuale positività dei campioni, data dal legame tra il bromuro di etidio ed il DNA.

6.2.5. Altri metodi diagnostici

IFAT. L'antigene è stato ottenuto da promastigoti di *L. infantum* MON-1, coltivati su terreno EMTM e mantenuti a 22 °C, raccolti in fase logaritmica e sottoposti a tre lavaggi con PBS a pH 7,2 e ad un lavaggio con NaCl allo 0,03% per indurre l'emolisi. I promastigoti sono stati diluiti in modo da ottenere circa 15 parassiti per campo microscopico a 400x. Il test è stato eseguito secondo il protocollo di Mancianti e Meciani (1988). In breve, i promastigoti di coltura sono stati posti su appositi vetrini, lasciati asciugare e fissati in acetone puro per 10', quindi passati per 5' in soluzione tampone PBS a pH 7,2. I sieri sono stati diluiti per raddoppio in base 10, con soglia di positività a 1/40, posti sui vetrini, incubati in camera umida per 30' a 37 °C. Dopo lavaggio con PBS a pH 7,2, è stata aggiunta l'antiglobulina marcata con

isotiocianato di fluorescina. Dopo un'ulteriore incubazione a 37 °C ed altri lavaggi, i vetrini sono stati montati con coprioggetto in glicerina tamponata a pH 7,2 ed osservati al microscopio a fluorescenza.

Come riportato nella Tabella 15, l'isolamento in coltura è stato tentato in due casi (soggetti 12SFNn e 14CSOt), utilizzando il terreno di Evans e, come campioni, biopsie linfonodali e midollari. In 10 casi è stato eseguito l'agoaspirato linfonodale, con successivo striscio del materiale e fissazione-colorazione con Diff-Quick[®] (Dade[™], Milano) (6 soggetti) o Parrot-Lestoquard (4 soggetti). In 2 casi è stato effettuato un test rapido ambulatoriale (Speed-Leish[®], BVT[™], La Seyne-sur-Mer, FR), secondo il protocollo del produttore, utilizzando sangue intero od anticoagulato.

6.3. Risultati

Tabella 16 - Risultati dei test diagnostici effettuati: è segnalato il risultato positivo (**POS**), negativo (**NEG**), non giudicabile (**ng**) o il valore rilevato; le caselle vuote rappresentano esami non effettuati.

Soggetto	Test rapido	FNA Inf ¹⁴⁶	Coltura	IFAT	PCR	Cytospin®
1GPJa				1/80	NEG	NEG
2GMRI				1/2.560	NEG	ng
3CTNn		POS		1/640	POS	POS
4VVTh				1/80	NEG	ng
5GCAr				1/80	NEG	NEG
6PPPi	POS				ng	ng
7PPRo	POS			1/160	POS	NEG
8SNBe		POS		1/320	POS	POS
9SNBi				1/160	POS	POS
10SFNn		POS		1/320	POS	NEG
11NPNn		POS		1/320	POS	POS
12SFNn		POS	POS ¹⁴⁷	1/160	POS	POS
13CSTo				1/320	NEG	NEG
14CSOt			NEG	1/160	NEG	NEG
15CPNn		POS		1/640	POS	POS
16GCBi				1/320	POS	NEG
17NBNn				NEG	NEG	NEG
18GLRo		POS		1/640	POS	POS
19GLZo		POS		1/640	POS	POS
20GMLi				1/640	NEG	NEG
21MADi		POS		1/320	POS	POS
22CDNn				1/160	POS	NEG
23CSNn		POS		1/320	POS	POS

¹⁴⁶ Agoaspirato linfonodale.

¹⁴⁷ Colture positive sia da linfonodo che da midollo osseo; in quest'ultimo caso i promastigoti in coltura erano meno vitali e meno numerosi.

Dei 23 soggetti originariamente inseriti nello studio, 3 sono stati esclusi in quanto la citocentrifugazione non ha fornito risultati accettabili (Tabella 16), per cui i casi totali valutabili nel presente lavoro sono risultati 20.

In un soggetto (7PPRo) la positività al test immunocromatografico ambulatoriale è stata confermata dall'IFAT (1/160) e dalla PCR, ma non dalla citocentrifugazione. Tutti i 10 soggetti con puntato linfonodale positivo, sono risultati positivi anche all'IFAT (con titolo da 1/160 a 1/640) ed alla PCR e, con l'esclusione di un soggetto (10SFNn), anche alla citocentrifugazione. Nei due casi in cui è stato tentato l'isolamento in coltura, il soggetto con risultato positivo (12SFNn) è stato confermato anche dal puntato linfonodale, dall'IFAT (1/160), dalla PCR e dalla citocentrifugazione; mentre il soggetto con coltura negativa (14CSOt), anche se positivo all'IFAT (1/160), è risultato negativo anche alla PCR ed alla citocentrifugazione. Tutti i soggetti sono risultati positivi all'IFAT (con titolo da 1/80 a 1/640), tranne uno (17NBNn), risultato negativo anche alla PCR ed alla citocentrifugazione.

La PCR su sangue periferico è risultata positiva in 14 soggetti e negativa in 6. La citocentrifugazione ha fornito risultati positivi in 10 casi e negativi negli altri 10; tutti i 10 casi positivi hanno trovato conferma dalla PCR (oltre che dall'IFAT), mentre 4 casi negativi alla citocentrifugazione, sono risultati positivi alla PCR. Gli amastigoti rilevati sono sempre stati in numero molto limitato (da 1 a 3), in sede extracellulare e/o intraneutrofilica (mai più di un amastigote endocellulare).

Considerando la PCR come il test *gold standard*, si possono calcolare la sensibilità, la specificità ed i valori predittivi relativi dell'esame microscopico del citocentrifugato, in base ai risultati del presente studio: 10 risultati veri positivi, 0 falsi positivi, 4 falsi negativi, 6 veri negativi (Tabella 17, Tabella 18).

Tabella 17 - Comparazione dei risultati tra PCR (*gold standard*) ed esame microscopico del citocentrifugato. **VP** = Veri Positivi, **FP** = Falsi positivi, **FN** = Falsi Negativi, **VN** = Veri Negativi.

		PCR (<i>gold standard</i>)	
		+	-
Esame microscopico del citocentrifugato	+	VP 10	FP 0
	-	FN 4	VN 6

Tabella 18 - Indici statistici, formule e risultati (Altman e Bland, 1994[1][2]).

Indice statistico	Formula	Risultato (%)
<i>Sensibilità</i>¹⁴⁸	$\frac{VP}{VP + FN}$	71,4
<i>Specificità</i>¹⁴⁹	$\frac{VN}{VN + FP}$	100
<i>Valore predittivo positivo</i>¹⁵⁰	$\frac{VP}{VP + FP}$	100
<i>Valore predittivo negativo</i>¹⁵¹	$\frac{VN}{FN + VN}$	60

¹⁴⁸ Percentuale dei soggetti veri positivi correttamente identificati dal test.

¹⁴⁹ Percentuale dei soggetti veri negativi correttamente identificati dal test.

¹⁵⁰ Percentuale dei soggetti diagnosticati correttamente in caso di risultato positivo.

¹⁵¹ Percentuale dei soggetti diagnosticati correttamente in caso di risultato negativo.

6.4. Discussione

Nella leishmaniosi canina il rinvenimento di amastigoti nel sangue periferico tramite gli strisci convenzionali è un evento eccezionale (Domina e Catarsini, 1983; Domina *et al.*, 1987; Foglia Manzillo *et al.*, 2005). In letteratura c'è una sola segnalazione in cui questo tipo di indagine ha dato risultati interessanti: 36 strisci positivi su 42, ottenuti da 38 soggetti sintomatici (Reale *et al.*, 1999). Non si ha alcun dato certo inerente la parassitemia nel cane, anche se è evidente che la disseminazione ematogena del parassita si può realizzare, in considerazione della possibile rilevazione in moltissimi organi e tessuti dell'organismo (Foglia Manzillo *et al.*, 2005). È stato ipotizzato che tale disseminazione avverrebbe prima a carico degli organi abbondanti di cellule del sistema reticolo-istiocitario, e successivamente a livello cutaneo (de Fátima Madeira *et al.*, 2006). Secondo Reithinger e coll. (2000) inizialmente il parassita si localizza a livello del sito dermico d'infezione e la disseminazione ematogena avviene dopo un periodo di tempo imprecisato ed imprevedibile. De Freitas e coll. (2006) affermano che la parassitemia si può realizzare, sia in soggetti sintomatici che asintomatici, ma con frequenza del tutto episodica ed incostante. Può infatti avvenire che soggetti con PCR positiva su linfonodo o cute, abbiano la PCR su sangue periferico negativa (Mancianti e Franceschi, 2006). Le diverse percentuali di risultati falsamente negativi alla PCR su sangue periferico riportate in letteratura, dipendono anche dalla variabilità dei protocolli: 61,5% (8 su 13) in uno dei primi studi sulla PCR qualitativa su sangue intero (Mathis e Deplazes, 1995); 5,2% (1 su 19) in un lavoro sulla valutazione della PCR *nested* sulla frazione ematica mononucleata (Fisa *et al.*, 2001); 16% (4 su 25) in uno studio sulla PCR *real-time* a partire da sangue intero (Francino *et al.*, 2006).

Per la rilevazione della parassitemia nel cane e nell'uomo sono stati impiegati diversi test diagnostici: xenodiagnosi (per es.: facendo alimentare i flebotomi sul sangue di pazienti umani [Molina *et al.*, 1992]); isolamento in coltura, osservazione di strisci di sangue periferico (Tabella 11, Tabella 12); PCR su sangue intero o sulla frazione leucocitaria (nel cane: Mathis e Deplazes, 1995; Reale *et al.*, 1999; Reithinger *et al.*, 2000; Fisa *et al.*, 2001; Lachaud *et al.*, 2001, 2002; Francino *et al.*, 2006; Franceschi *et al.*, 2007; Tabar *et al.*, 2008). In realtà la PCR permette di diagnosticare l'infezione da *Leishmania* dimostrando la presenza del relativo DNA, e diversi Autori

sottolineano che la positività ad una PCR qualitativa può non corrispondere sempre ed invariabilmente alla presenza di amastigoti vitali (Xavier *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 2007). Però Alvar e coll. (2004) riportano che il DNA di *Leishmania* non sarebbe più rilevabile al massimo dopo 21 giorni dalla distruzione del parassita; inoltre sperimentalmente è stato dimostrato che già un'ora dopo la morte degli amastigoti intracellulari, il DNA scende a livelli inferiori all'1% rispetto a quelli precedenti al trattamento leishmanicida (Prina *et al.*, 2007).

Nel presente lavoro, 10 dei 14 soggetti risultati positivi alla PCR, sono stati confermati con la presenza di amastigoti intatti nel sangue periferico (71,4%). Purtroppo non è dato sapere inequivocabilmente se i 4 soggetti positivi alla PCR ma non all'osservazione del citocentrifugato, non siano stati effettivamente parassitemici, oppure se la discrepanza sia dipesa da un difetto effettivo della sensibilità del metodo oggetto del lavoro. Appare più probabile questa seconda possibilità, per diverse ragioni: in primo luogo, i 4 soggetti sono risultati anche IFAT-positivi, inoltre erano sintomatici ed in un caso il parassita era stato evidenziato nel puntato linfonodale. Per le stesse ragioni, i 6 soggetti risultati negativi alla PCR ed all'esame del citocentrifugato, verosimilmente rappresentano casi non parassitemici, piuttosto che falsi negativi, anche se il puntato linfonodale non è stato eseguito.

Il metodo studiato è risultato discretamente sensibile (71,4%), in relazione alla bassissima sensibilità dell'esame degli strisci convenzionali (Abranches *et al.*, 1983), ed anche in relazione all'impiego dell'isolamento in coltura: in uno studio, solo 4 campioni ematici su 18 (sensibilità 21%) con PCR *nested* positiva, hanno permesso l'isolamento (Fisa *et al.*, 2001). La parassitemia non è risultata essere associata ad un particolare quadro sintomatologico, anche se i casi inseriti nello studio sono stati riferiti da veterinari in seguito alla visita nella normale pratica clinica, per cui non si hanno notizie sufficienti sulla parassitemia nei casi d'infezione asintomatica (un solo soggetto è stato riferito come asintomatico e, a fronte della positività all'IFAT, è risultato negativo sia alla PCR che all'esame del citocentrifugato). Non c'è stata alcuna segnalazione di casi febbrili, mentre in uno studio la parassitemia è risultata associata all'ipertermia (39,9 °C: Santos *et al.*, 2006) in un quadro generale piuttosto grave, che di solito caratterizza i cani oggetto delle singole segnalazioni bibliografiche (Domina e Catarsini, 1983; Domina *et al.*, 1987; Foglia Manzillo *et al.*, 2005; da

Costa Vieira *et al.*, 2007). Si tratta in genere di soggetti con un quadro ematologico profondamente alterato, con anemia e leucocitosi neutrofila, quadro che è stato in qualche misura “riprodotto” dal trattamento a cui i campioni di sangue sono stati sottoposti nel presente lavoro (emolisi e concentrazione dei leucociti). In presenza di queste alterazioni, è quindi consigliabile eseguire l’analisi scrupolosa degli strisci di sangue convenzionali, soprattutto se coesiste un’infezione da *Ehrlichia canis* (Foglia Manzillo *et al.*, 2005). È interessante rilevare che, nel presente studio e nelle altre segnalazioni bibliografiche, gli amastigoti sono stati rilevati, oltre che in sede extracellulare, all’interno dei granulociti neutrofili, il cui ruolo nel controllo dell’infezione da *Leishmania* non è ancora molto chiaro, al contrario di quello dei macrofagi che rappresentano le principali cellule effettrici della risposta immunitaria all’infezione, sia innata che acquisita (Foglia Manzillo *et al.*, 2005). Studi sperimentali sull’interazione tra fagociti umani e *Leishmania*, hanno rivelato che i granulociti neutrofili ed eosinofili sono in grado di fagocitare e distruggere il parassita, e che l’efficienza fagocitaria e di *killing* dei neutrofili è paragonabile a quella dei macrofagi (Chang, 1981; Pearson *et al.*, 1987). Inoltre nell’infezione sperimentale da *L. major* di topi BALB/c è stato dimostrato che neutrofili e monociti possono trasportare gli amastigoti nel sangue periferico (Hill, 1986) e che i polimorfonucleati sono le cellule che per prime entrano in contatto con il parassita, permettendone l’internalizzazione nei macrofagi (van Zandbergen *et al.*, 2004). Per quanto riguarda specificamente il cane, Brandonisio e coll. (1996) hanno dimostrato la capacità fagocitaria e di *killing* dei neutrofili, suggerendo un ruolo di queste cellule nei meccanismi difensivi contro *Leishmania*; inoltre, in soggetti inoculati sperimentalmente per via intradermica con promastigoti di *L. infantum*, 3,5 ore dopo, negli strisci delle impronte cutanee sono stati osservati numerosi neutrofili e solo pochi macrofagi parassitati (Santos-Gomes *et al.*, 2000).

I punti critici della metodica sono risultati essenzialmente due:

- La necessità di sottoporre ad esame il sangue di soggetti non precedentemente sottoposti a terapia, benché in medicina umana venga preconizzata la tecnica anche nel monitoraggio terapeutico (Petithory *et al.*, 1997; Chemli *et al.*, 2006);

- L'utilizzo di campioni ematici freschi, comunque non più vecchi di 2-3 giorni (refrigerati) ed assolutamente non congelati. Nel presente studio, a parte i 3 casi eliminati nella fase iniziale, probabilmente per problemi di confidenza con la metodica, altri 10 casi, il cui sangue era stato congelato a lungo, non sono stati inseriti perché hanno fornito risultati illeggibili, soprattutto per la distruzione massiva delle cellule ematiche, come apparso evidente all'analisi dei citocentrifugati. Sugli stessi campioni la PCR è risultata negativa, molto probabilmente a causa di una forte inibizione dovuta alla massiccia presenza di residui emoglobinici derivati dall'emolisi conseguente allo scongelamento o alla lunga conservazione (Mathis e Deplazes, 1995).

Come è risultato anche da precedenti pubblicazioni in campo umano (Petithory *et al.*, 1997; Chemli *et al.*, 2006), il presente lavoro ha dimostrato una buona affidabilità della citocentrifugazione nella rilevazione degli amastigoti di *Leishmania* nel sangue periferico, con richieste tecniche ed economiche (reagenti) certamente inferiori rispetto ad altre metodiche, come il QBC[®] (*Quantitative Buffy Coat*) o la PCR, benché l'impegno economico per l'acquisto di una citocentrifuga di ultima generazione, sia certamente un aspetto da non sottovalutare¹⁵². Inoltre la sensibilità, buona ma non eccellente (71,4%), fa sì che la metodica abbia più un valore di studio nella valutazione della parassitemia (in particolare in relazione alla PCR), rispetto al valore come diagnosi clinica primaria. Comunque la resa microscopica dei monostrati cellulari ottenuti dalla citocentrifugazione, soprattutto quando fissati/colorati con il metodo di Parrot-Lestoquard, è di gran lunga superiore a quella dei normali strisci ematici, permettendo una ricerca del parassita più agevole ed anche in tempi più contenuti, in quanto la superficie del vetrino da analizzare è limitata al *pellet* di 6 mm di diametro ed avente l'area di 28 mm².

¹⁵² Circa 8.000 € IVA esclusa per il modello Cytospin IV[®] (Shandon[™]).

7. BIBLIOGRAFIA

1. Abate O., Vittone V., Zanatta R., Tarducci A., Borgarelli M., Bellino C., Cagnasso A.: "Valutazione qualitativa della proteinuria mediante SDS-AGE ai fini della localizzazione del danno renale nel cane e nel gatto". *Veterinaria*, A.19(1):9-14, 2005;
2. Abranches P., Lopes F., Silva F.M.C., Ribeiro M.M.S., Pires C.A.: "Le Kala-azar au Portugal. III. Résultats d'une enquête sur la leishmaniose canine réalisée dans les environs de Lisbonne. Comparaison des zones urbaines et rurales". *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 58(4):307-15, 1983;
3. Abranches P.: "Reservoirs of visceral leishmaniasis". In "Leishmaniasis. The Current Status and New Strategies for Control". Ed. D.T. Hart, Plenum Press, New York, 61-9, 1989;
4. Abranches P., Silva-Pereira M.C.D., Conceição-Silva F.M., Santos-Gomes G., Janz J.G.: "Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection". *J. Parasitol.*, 77:557-61, 1991;
5. Acedo-Sánchez C., Martín Sánchez J., Vélez Bernal I.D., Sanchís Marín M.C., Louassini M., Maldonado J.A., Morillas Márquez F.: "Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra region (Granada Province, southern Spain)". *Int. J. Parasitol.*, 26(3):303-10, 1996;
6. Adamama-Moraitou K.K., Saridomichelakis M.N., Polizopoulou Z., Kritsepi M., Tsompanakou A., Koutinas A.F.: "Short-term exogenous glucocorticosteroidal effect on iron and copper status in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*)". *Can. J. Vet. Res.*, 69(4):287-92, 2005;
7. Adler S.: "Attempts to transmit visceral leishmaniasis to man". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 33(4):419-37, 1940;
8. Ajdary S., Riazi-Rad F., Jafari-Shakib R., Mohebbali M.: "Soluble CD26/CD30 levels in visceral leishmaniasis: markers of disease activity". *Clin. Exp. Immunol.*, 145(1):44-7, 2006;
9. Albanese F., Poli A., Millanta F., Abramo F.: "Primary cutaneous extragenital canine transmissible venereal tumour with *Leishmania*-laden neoplastic cells: a further suggestion of histiocytic origin?". *Vet. Dermatol.*, 13(5):243-6, 2002;
10. Al-Khateeb G.H., Al-Jeboori T.I., Al-Janabi K.A.: "In vitro efficacy of some drugs on promastigotes of *Leishmania donovani*". *Chemotherapy*, 23(4):267-75, 1977;
11. Almeida M.C., Cuba-Cuba C.A., Moraes M.A., Miles M.A.: "Dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis*". *J. Comp. Pathol.*, 115(3):311-6, 1996;
12. Altet L., Francino O., Solano-Gallego L., Renier C., Sánchez A.: "Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs". *Infect. Immun.*, 70(6):2763-71, 2002;
13. Altman D.G., Bland J.M.: "Diagnostic tests 1: Sensitivity and specificity". *BMJ*, 308(6943):1552, 1994[1];
14. Altman D.G., Bland J.M.: "Diagnostic tests 2: Predictive values". *BMJ*, 309(6947):102, 1994[2];
15. Alvar J., Cañavate C., Molina R., Moreno J., Nieto J.: "Canine leishmaniasis". In "Advances in Parasitology", 57:1-88, 2004;
16. Amela C., Mendez I., Torcal J.M., Medina G., Pachón I., Cañavete C., Alvar J.: "Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain". *Eur. J. Epidemiol.*, 11:1-5, 1995;

17. Amela C., López-Gay D., Alberdi J.C., Castilla J. : "Injecting drug use as risk factor for visceral leishmaniasis in AIDS patients". Eur. J. Epidemiol., 12(1):91-2, 1996;
18. Amusategui I., Sainz A., Rodríguez F., Tesouro M.A.: "Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis". Eur. J. Epidemiol., 18(2):147-56, 2003;
19. Andrade H.M., de Toledo Vde P., Marques M.J., França Silva J.C., Tafuri W.L., Mayrink W., Genaro O.: "*Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs". Vet. Parasitol. 103(1-2):71-81, 2002;
20. Antoniou M., Haralambous C., Mazeris A., Pratlong F., Dedet J.P., Soteriadou K. : "*Leishmania donovani* leishmaniasis in Cyprus". Lancet. Infect. Dis., 8(1):6-7, 2008;
21. Araujo e Silva E., Andreotti R., Honer M.R.: "Comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal da leishmaniose visceral americana, em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul". Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 40(4):420-5, 2007;
22. Archibald R.G., Mansour H.: "Some observations on the epidemiology of kala-azar in the Sudan". Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 30(4):395-406, 1937;
23. Arneson W., Brickell J.: "Assessment of renal function". In "Clinical chemistry. A laboratory perspective", ed. W. Arneson, J. Brickell, F.A. Davis Company, Philadelphia, 201-32, 2007;
24. Arnoult D., Akarid K., Grodet A., Petit P.X., Estaquier J., Ameisen J.C.: "On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization". Cell Death Differ. 9(1):65-81, 2002;
25. Aresu L., Valenza F., Ferroglio E., Pregel P., Uslenghi F., Tarducci A., Zanatta R.: "Membranoproliferative glomerulonephritis type III in a simultaneous infection of *Leishmania infantum* and *Dirofilaria immitis* in a dog". J. Vet. Diagn. Invest., 19(5):569-72, 2007;
26. Arora S.K., Sinha R., Sehgal S.: "Use of in vitro method to assess different brands of anti-leishmanial drugs". Med. Microbiol. Immunol., 180(1):21-7, 1991;
27. Arranz-Caso J.A., Albarrán-Hernández F., Cuadrado-Gómez L.M., Gonzalez-Palacios R.: "Metronidazole treatment in a patient with AIDS and visceral leishmaniasis". AIDS, 9(12):1377-8, 1995;
28. Ashford R.W.: "Leishmaniasis reservoirs and their significance in control". Clin. Dermatol., 14:523-32, 1996;
29. Ashford D.A., David J.R., Freire M., David R., Sherlock I., Eulálio M.C., Sampaio D.P., Badaro R.: "Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil". Am. J. Trop. Med. Hyg., 59(1):53-7, 1998;
30. Atta A.M., Sousa-Atta M.L.B., D'Oliveira A., Almeida R.P., Araújo M.I., Carvalho E.M.: "IgG anti-IgE autoantibodies in visceral leishmaniasis". Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 97(1):101-3, 2002;
31. Baldi L., Mizzoni V., Guarino A.: "Vecchi e nuovi focolai di leishmaniosi canina in Campania". Parassitologia, 46(1-2):217-20, 2004;
32. Baneth G., Shaw S.E.: "Chemotherapy of canine leishmaniosis". Vet. Parasitol., 106(4):315-24, 2002;

33. Baptista-Fernandes T., Marques C., Rodrigues O.R., Santos-Gomes G.M.: "Intra-specific variability of virulence in *Leishmania infantum* zymodeme MON-1 strains". Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 30(1):41-53, 2007;
34. Barbiéri C.L.: "Immunology of canine leishmaniasis". Parasite Immunol., 28(7):329-37, 2006;
35. Barsanti J.A., Lees G.E., Willard M.D., Green R.A.: "Urinary disorders". In "Small animal clinical diagnosis by laboratory methods", ed. M.D. Willard, H.T. Tvedten, G.H. Turnwald, 3rd ed., WB Saunders Company, 108-35, 1999;
36. Barsanti J.A.: "Insufficienza renale cronica: progressi nella terapia e nella gestione del paziente". In "Atti 5° Congresso Internazionale Merial™", 83-95, 2003;
37. Beck A., Beck R., Kusak J., Gudan A., Martinkovic F., Artukovic B., Hohsteter M., Huber D., Marinculic A., Grabarevic Z.: "A Case of Visceral Leishmaniasis in a Gray Wolf (*Canis lupus*) from Croatia". J. Wildl. Dis., 44(2):451-6, 2008;
38. Belhadj S., Pratlong F., Mahjoub H., Toumi N.H., Azaiez R., Dedet J.P., Chaker E.: "Leishmaniose viscérale infantile à *Leishmania infantum* MON-24: une réalité en Tunisie". Bull. Soc. Pathol. Exot., 93(1):12-3, 2000;
39. Belhadj S., Toumi N.H., Dakhli H., Kallel K., Boussen N., Ben Chaabane T., Chaker E.: "La culture du sang périphérique comme moyen diagnostique de la leishmaniose viscérale: à propos de 61 cas". Med. Trop. (Mars.), 62(2):155-7, 2002;
40. Belloli C., Ceci L., Carli S., Tassi P., Montesissa C., De Natale G., Marcotrigiano G., Ormas P.: "Disposition of antimony and aminosidine in dogs after administration separately and together: implications for therapy of leishmaniasis". Res. Vet. Sci., 58(2):123-7, 1995;
41. Benderitter T., Casanova P., Nashkidachvili L., Quilici M.: "Glomerulonephritis in dogs with canine leishmaniasis". Ann. Trop. Med. Parasitol., 82(4):335-41, 1988;
42. Benkova I., Volf P.: "Effect of temperature on metabolism of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae)". J. Med. Entomol., 44(1):150-4, 2007;
43. Berman J., Bryceson A.D., Croft S., Engel J., Gutteridge W., Karbwang J., Sindermann H., Soto J., Sundar S., Urbina J.A.: "Miltefosine: issues to be addressed in the future". Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 100 Suppl. 1:S41-4, 2006;
44. Besteiro S., Williams R.A., Coombs G.H., Mottram J.C.: "Protein turnover and differentiation in *Leishmania*". Int. J. Parasitol., 37(10):1063-75, 2007;
45. Bhattacharya S.K., Sinha P.K., Sundar S., Thakur C.P., Jha T.K., Pandey K., Das V.R., Kumar N., Lal C., Verma N., Singh V.P., Ranjan A., Verma R.B., Anders G., Sindermann H., Ganguly N.K.: "Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis". J. Infect. Dis., 196(4):591-8, 2007
46. Bianciardi P., Fasanella A., Foglia Manzillo V., Trotta T., Pagano A., Sorino S., Gradoni L., Oliva G.: "The efficacy of enrofloxacin, alone or combined with metronidazole, in the therapy of canine leishmaniasis". Parasitol. Res., 93(6):486-92, 2004;
47. Bianciardi P.: Incontro Virbac™ per la presentazione del Milteforan® - Firenze, 26 settembre 2007;
48. Bizzeti M.: "La sieroelettroforesi per il controllo nel cane della leishmaniosi". Obiett. Doc. Vet., 6:11-5, 1998;
49. Bizzeti M., Ariti G., Mancianti F., Franceschi A., Sgorbini M.: "Valutazione dell'efficacia dell'associazione ibafloxacin-metronidazolo nella terapia della leishmaniosi canina: studio preliminare". Annali Fac. Med. Vet. Pisa, LIX:171-9, 2006;

50. Bjorvatn B., Neva F.A.: "Experimental therapy of mice infected with *Leishmania tropica*". Am. J. Trop. Med. Hyg., 28(3):480-5, 1979;
51. Blackburn K., Wallbanks K.R., Molyneux D.H., Lavin D.R., Winstanley S.L.: "The peritrophic membrane of the female sandfly *Phlebotomus papatasi*". Ann. Trop. Med. Parasitol., 82(6):613-9, 1988;
52. Blavier A., Keroack S., Denerolle P., Goy-Thollot I., Chabanne L., Cadoré J.L., Bourdoiseau G.: "Atypical forms of canine leishmaniosis". Vet. J., 162(2):108-20, 2001;
53. Boarino A., Bollo E., Prunotto L., Canale L., Uslenghi F., Poletti P.: "Application of a recombinant protein for the serological diagnosis of canine leishmaniasis". Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., in stampa (doi:10.1016/j.cimid.2007.09.002), 2008;
54. Boden E. (ed.): "Black's Veterinary Dictionary". 21^a ed., A&C Black, London, 2005;
55. Bogdan C., Schönián G., Bañuls A.L., Hide M., Pratlong F., Lorenz E., Rölinghoff M., Mertens R.: "Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature". Clin. Infect. Dis., 32(2):302-6, 2001;
56. Boehme C.C., Hain U., Novosel A., Eichenlaub S., Fleischmann E., Löscher T.: "Congenital Visceral Leishmaniasis". [letter] Emerg. Infect. Dis., 12(2), 2006. <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol12no02/05-0449.htm> (accesso effettuato il 01.02.2008);
57. Boni M., Davoust B., Dereure J.: "Intérêt des techniques de laboratoire dans le diagnostic de la leishmaniose canine". Rev. Franç. Lab., 310:33-8, 1999;
58. Bossolasco S., Gaiera G., Olchini D., Gulletta M., Martello L., Bestetti A., Bossi L., Germagnoli L., Lazzarin A., Uberti-Foppa C., Cinque P.: "Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis". J. Clin. Microbiol., 41(11):5080-4, 2003;
59. Bossolasco S., Nozza S., Gaiera G., Bestetti A., Lazzarin A., Cinque P.: "Lack of immune recovery in HIV/*Leishmania* co-infection treated with human recombinant IL-2". AIDS, 21(9):1223-5, 2007;
60. Bourdoiseau G., Bonnefont C., Magnol J.P., Saint-André I., Chabanne L.: "Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis". Vet. Immunol. Immunopathol., 56(3-4):345-51, 1997[1];
61. Bourdoiseau G., Bonnefont C., Hoareau E., Boehringer C., Stolle T., Chabanne L.: "Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs". Vet. Immunol. Immunopathol., 59(1-2):21-30, 1997[2];
62. Bourdoiseau G., Bonnefont C., Chabanne L., Gevrey J.: "Modifications sanguines (cellulaires et humorales) chez le chien leishmanien. Suivi de chiens infectés traités et non traités". Revue Méd. Vét., 148(3):219-28, 1997[3];
63. Bowdre J.H., Campbell J.L., Walker D.H., Tart D.E.: "American mucocutaneous leishmaniasis. Culture of a *Leishmania* species from peripheral blood leukocytes". Am. J. Clin. Pathol., 75(3):435-8, 1981;
64. Brahmachari U.N., Dutt M.B.: "Dermal leishmanoid with positive flagellate culture from the peripheral blood". J. Trop. Med. Hyg., 30:158-159, 1927;
65. Brandonisio O., Panunzio M., Faliero S.M., Ceci L., Fasanella A., Puccini V.: "Evaluation of polymorphonuclear cell and monocyte functions in *Leishmania infantum*-infected dogs". Vet. Immunol. Immunopathol., 53(1-2):95-103, 1996;

66. Braun J.P., Lefebvre H.P., Watson A.D.J.: "Creatinine in the dog: a review". Vet. Clin. Pathol., 32(4):162-79, 2003;
67. Braun J.P., Cabé E., Geffré A., Lefebvre H.P., Trumel C.: "Comparison of plasma creatinine values measured by different veterinary practices". Vet. Rec., 162(7):215-6, 2008;
68. Bray R.S.: "Leishmania". Annu. Rev. Microbiol., 28(0):189-217, 1974;
69. Bray R.S.: "The zoonotic potential of reservoirs of leishmaniasis in the Old World". Ecol. Dis. 1:257-67, 1982;
70. Brown S.A., Brown C.A., Crowell W.A., Barsanti J.A., Kang C.W., Allen T., Cowell C., Finco D.R.: "Effects of dietary polyunsaturated fatty acid supplementation in early renal insufficiency in dogs". J. Lab. Clin. Med., 135(3):275-86, 2000;
71. Cabello I., Caraballo A., Millan Y.: "Leishmaniasis in the genital area". Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 44(2):105-7, 2002;
72. Cain C., Stone M.S., Thieberg M., Wilson M.E.: "Nonhealing genital ulcers. Cutaneous leishmaniasis". Arch. Dermatol., 130(10):1313-6, 1994;
73. Campino L.M., Capela M.J.R., Maurício I., Ozensoy S.: "O Kala-azar em Portugal. IX. A região do Algarve: Inquérito epidemiológico sobre o reservatório canino na região de Loulé". Rev. Port. Doenças Infecciosas, 18:189-94, 1995;
74. Campino L.M.: "Canine reservoirs and leishmaniasis: Epidemiology and disease". In "World Class Parasites: Volume 4 - Leishmania", ed. Jay P. Farrell, Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrech, London, 45-57, 2002;
75. Capelli G., Baldelli R., Ferroglio E., Genchi C., Gradoni L., Gramiccia M., Maroli M., Mortarino M., Pietrobelli M., Rossi L., Ruggiero M.: "Monitoraggio della leishmaniosi canina in nord Italia: aggiornamenti da un network scientifico". Parassitologia, 46(1-2):193-7, 2004;
76. Cardo L.J.: "Serological screening for *Leishmania infantum* in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Sicily, Italy)". Transfus. Apher. Sci., 34(2):233-4, 2006;
77. Cardoso L., Neto F., Sousa J.C., Rodrigues M., Cabral M.: "Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity". Vet. Parasitol., 79(3):213-20, 1998;
78. Cardoso L., Schallig H.D., Cordeiro-da-Silva A., Cabral M., Alunda J.M., Rodrigues M.: "Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs". Vet. Immunol. Immunopathol., 117(1-2):35-41, 2007;
79. Carrasco L., de Lara F.C., Martin E., Hervás J., Molleda J.M., Gómez-Villamandos J.C., López R.: "Acute haemorrhagic pancreatitis associated with canine visceral leishmaniasis". Vet. Rec., 141(20):519-21, 1997;
80. Carrera L., Fermín M.L., Tesouro M., García P., Rollán E., González J.L., Méndez S., Cuquerella M., Alunda J.M.: "Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers". Exp. Parasitol., 82(2):139-46, 1996;
81. Casarosa L.: "Leishmania". In "Parassitologia degli animali domestici", Casa Ed. Ambrosiana, Terza edizione, 30-7, 1985[1];
82. Casarosa L.: "Insetti - Ditteri". In "Parassitologia degli animali domestici", Casa Ed. Ambrosiana, Terza edizione, 330, 1985[2];

83. Cerundolo R.: "Terapia della leishmaniosi canina". In "Atti Incontro SIDEV", 25 febbraio 2001;
84. Chamizo C., Moreno J., Alvar J.: "Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis". Vet. Immunol. Immunopathol., 103(1-2):67-75, 2005;
85. Chang K.P.: "Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes". Am. J. Trop. Med. Hyg., 30(2):322-33, 1981;
86. Chemli J., Abroug M., Fathallah A., Abroug S., Ben Said M., Harbi A.: "Apport de la leucoconcentration dans le diagnostic du Kala-azar en Tunisie". Med. Mal. Infect., 36(7):390-2, 2006;
87. Chopra R.N., Das Gupta C.R.: "Provocative action of organic compounds of antimony in leishmaniasis". Trop. Dis. Bull., 25:423-4, 1928;
88. Choudhury K., Zandera D., Kube M., Reinhardt R., Clos J.: "Identification of a *Leishmania infantum* gene mediating resistance to miltefosine and Sb^{III}". Int. J. Parasitol., in stampa (doi:10.1016/j.ijpara.2008.03.005), 2008;
89. Christophers S.R.: "On a parasite found in persons suffering from enlargement of the spleen in India. Second report". Scientific Memoirs, 11:1-21, 1904;
90. Chulay J.D., Bhatt S.M., Muigai R., Ho M., Gachihi G., Were J.B., Chunge C., Bryceson A.D.: "A comparison of three dosage regimens of sodium stibogluconate in the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya". J. Infect. Dis., 148(1):148-55, 1983;
91. Chulay J.D., Adoyo M.A., Githure J.I.: "*Leishmania donovani* parasitaemia in Kenyan visceral leishmaniasis". Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 79(2):218-22, 1985;
92. Ciaramella P., Oliva G., Luna R.D., Gradoni L., Ambrosio R., Cortese L., Scalone A., Persechino A.: "A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*". Vet. Rec., 141(21):539-43, 1997;
93. Ciaramella P., De Luna R.: "Leishmaniosi del cane: aspetti clinico-diagnostici". Obiett. Doc. Vet., 4(Suppl.):13-25, 1999;
94. Ciaramella P., Cortese L., Corona M., Ambrosio R., Di Loria A., Persechino A.: "Plasma thrombomodulin levels in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*". Vet. Res. Commun., 28(Suppl. 1):327-30, 2004;
95. Cole A.C.E., Cosgrove P.C., Robinson G.: "A preliminary report of an outbreak of kala-azar in a battalion of King's African Rifles". Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 36(1):25-34, 1942;
96. Colomba C., Saporito L., Polara V.F., Barone T., Corrao A., Titone L.: "Serological screening for *Leishmania infantum* in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Sicily, Italy)". Transfus. Apher. Sci., 33(3):311-4, 2005;
97. Concordet D., Vergez F., Trumel C., Diquélou A., Lanore D., Le Garrères A., Pagès J.P., Péchereau D., Médaille C., Braun J.P.: "A multicentric retrospective study of serum/plasma urea and creatinine concentrations in dogs using univariate and multivariate decision rules to evaluate diagnostic efficiency". Vet. Clin. Pathol., 37(1):96-103, 2008;
98. Corazza M., Mancianti F., Poli A., Torres S.: "Immunologia della leishmaniosi". Obiett. Doc. Vet., 6:5-14, 1999;
99. Corona M., Ciaramella P., Pelagalli A., Cortese L., Pero M.E., Santoro D., Lombardi P.: "Haemostatic disorders in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*". Vet. Res. Commun., 28(Suppl. 1):331-4, 2004;

100. Cortadellas O., del Palacio M.J., Bayón A., Albert A., Talavera J.: "Systemic hypertension in dogs with leishmaniasis: prevalence and clinical consequences". J. Vet. Intern. Med., 20(4):941-7, 2006;
101. Cortadellas O., Fernández Del Palacio M.J., Talavera J., Bayón A.: "Glomerular filtration rate in dogs with leishmaniasis and chronic kidney disease". J. Vet. Intern. Med., 22(2):293-300, 2008;
102. Costa F.A., Guerra J.L., Silva S.M., Klein R.P., Mendonça I.L., Goto H.: "CD4(+) T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis". Braz. J. Med. Biol. Res., 33(12):1455-8, 2000;
103. Costa F.A., Goto H., Saldanha L.C., Silva S.M., Sinhorini I.L., Silva T.C., Guerra J.L.: "Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis". Vet. Pathol., 40(6):677-84, 2003;
104. Coutinho M.T., Bueno L.L., Sterzik A., Fujiwara R.T., Botelho J.R., De Maria M., Genaro O., Linardi P.M.: "Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis". Vet. Parasitol., 128(1-2):149-55, 2005;
105. Coutinho M.T., Linardi P.M.: "Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals?". Vet. Parasitol., 147(3-4):320-5, 2007;
106. Cowell R.L., Dorsey K.E.: "Cytologic examination". In "Laboratory procedures for veterinary technicians", ed. C.M. Hendrix, 4th ed., Mosby, St. Louis, Missouri, USA, 453-74, 2002;
107. Cowell R.L., Dorsey K.E., Meinkoth J.H.: "Lymph node cytology". Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract., 33(1):47-67, 2003;
108. Cringoli G., Rinaldi L., Capuano F., Baldi L., Veneziano V., Capelli G.: "Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs". Vet. Parasitol., 106(4):307-13, 2002;
109. Cruz I., Chicharro C., Nieto J., Bailo B., Cañavate C., Figueras M.C., Alvar J.: "Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis". J. Clin. Microbiol., 44(7):2343-7, 2006;
110. Cuba-Cuba C.A., Llanos-Cuentas E.A., Marsden P.D.: "Failure to detect circulating *Leishmania* in mucocutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*". Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 80(2):346, 1986;
111. Cunha S., Freire M., Eulalio C., Cristosvao J., Netto E., Johnson Jr. W., Reed S.G., Badaró R.: "Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil". Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 89:155-8, 1995;
112. da Costa Vieira R.F., Rossi C.N., da Silva A.R., Gomes A.A., Ikeda-Garcia F.A., Feitosa M.M., Ciarlini P.C.: "Detecção de *Leishmania* sp. em sangue periférico de cão". Acta Scientiae Vet., 35(Suppl. 2):562-3, 2007;
113. David J.R., Stamm L.M., Bezerra H.S., Souza R.N., Killick-Kendrick R., Lima J.W.: "Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*". Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 96(6):839-47, 2001;
114. Dantas-Torres F.: "Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine". Vet. Parasitol., 141(1-2):1-8, 2006;

115. Dantas-Torres F.: "The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*". Vet. Parasitol., 149(3-4):139-46, 2007;
116. da Silva E.S., van der Meide W.F., Schoone G.J., Gontijo C.M., Schallig H.D., Brazil R.P.: "Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays". Vet. Res. Commun., 30(6):637-43, 2006;
117. Dedet J.P.: "Current Status of Epidemiology of Leishmaniasis". In "World Class Parasites: Volume 4 - Leishmania", ed. Jay P. Farrell, Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrech, London, 1-10, 2002;
118. de Fátima Madeira M., de O Schubach A., Schubach T.M., Pereira S.A., Figueiredo F.B., Baptista C., Leal C.A., Melo C.X., Confort E.M., Marzochi M.C.: "Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil". Vet. Parasitol., 138(3-4):366-70, 2006;
119. de Freitas E., Melo M.N., da Costa-Val A.P., Michalick M.S.: "Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors". Vet. Parasitol. 137(1-2):159-67, 2006;
120. Degl'Innocenti R., Saponetto N., Pizzirani S., Mancianti F.: "Diagnosi di laboratorio. Esame colturale". In "La leishmaniosi canina", ed. SCIVAC (Ev. Srl):57-8, 1989;
121. Delgado J., Pineda J.A., Macías J., Regordán C., Gallardo J.A., Leal M., Sanchez-Quijano A., Lissen E.: "Low sensitivity of peripheral blood smear for diagnosis of subclinical visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1-infected patients". J. Clin. Microbiol., 36(1):315-6, 1998;
122. de Lima V.M., Peiro J.R., de Oliveira Vasconcelos R.: "IL-6 and TNF- α production during active canine visceral leishmaniasis". Vet. Immunol. Immunopathol., 115(1-2):189-93, 2007;
123. Denerolle, P.: "Leishmaniose canine: difficulté du diagnostic et du traitement (125 cas)". Prat. Méd. Chir. Anim. Comp., 31:137-45, 1996;
124. Denerolle P., Bourdoiseau G.: "Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases)". J. Vet. Intern. Med., 13(5):413-5, 1999;
125. Deplazes P., Smith N.C., Arnold P., Lutz H., Eckert J.: "Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites". Parasite Immunol., 17(9):451-8, 1995;
126. Deplazes P., Grimm F., Papaprodromou M., Cavaliero T., Gramiccia M., Christofi G., Christofi N., Economides P., Eckert J.: "Canine leishmaniasis in Cyprus due to *Leishmania infantum* MON-1". Acta Trop., 71:169-78, 1998;
127. Dereure J., Pratlong F., Reynes J., Basset D., Bastien P., Dedet J.P.: "Haemoculture as a tool for diagnosing visceral leishmaniasis in HIV-negative and HIV-positive patients: interest for parasite identification". Bull. World Health Organ., 76(2):203-6, 1998;
128. Desport E., Robert R.: "Marqueurs de souffrance rénale - Imagerie". In "L'insuffisance rénale aiguë", ed. L. Jacob, Springer, Paris, Berlin, Heidelberg, New York, 67-84, 2007;
129. Dey A., Singh S.: "Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature". Indian J. Med. Microbiol., 24(3):165-70, 2006;

130. Dietze R., Barros G.B., Teixeira L., Harris J., Michelson K., Falqueto A., Corey R.: "Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil". *Clin. Infect. Dis.*, 25(5):1240-2, 1997;
131. Diniz S.A., Melo M.S., Borges A.M., Bueno R., Reis B.P., Tafuri W.L., Nascimento E.F., Santos R.L.: "Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs". *Vet. Pathol.*, 42(5):650-8, 2005;
132. Dipineto L., Manna L., Baiano A., Gala M., Fioretti A., Gravino A. E., Menna L. F.: "Presence of *Leishmania infantum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in southern Italy". *J. Wildl. Dis.*, 43(3):518-20, 2007;
133. Disch J., Oliveira M.C., Orsini M., Rabello A.: "Rapid clearance of circulating *Leishmania* kinetoplast DNA after treatment of visceral leishmaniasis". *Acta Trop.*, 92(3):279-83, 2004;
134. Domina F., Catarsini O.: "Eccezionale reperto di leishmanie in elementi circolanti". *Atti SISVET*, 37:359-61, 1983;
135. Domina F., Pugliese A., Catarsini O.: "Leishmanie nel sangue circolante di cani con leishmaniosi". *Obiett. Doc. Vet.*, 1:57-60, 1987;
136. Donovan C.: "Human piroplasmosis". *Lancet*, 164(4228):741-808, 1904;
137. Dougherty M.J., Hamilton J.G., Ward R.D.: "Isolation of oviposition pheromone from the eggs of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*". *Med. Vet. Entomol.*, 8(2):119-24, 1994;
138. Dow S.W., LeCouteur R.A., Poss M.L., Beadleston D.: "Central nervous system toxicosis with metronidazole treatment of dogs: five cases (1984-1987)". *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 195(3):365-8, 1989;
139. Dunan S., Frommel D., Monjour L., Ogunkolade B.W., Cruz A., Quilici M.: "Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis. Phocian Veterinary Study Group on Visceral Leishmaniasis". *Parasite Immunol.*, 11(4):397-402, 1989;
140. Edeson J.F., Himo J.: "*Leishmania* sp. in the blood of a lizard (*Agama stellio*) from Lebanon". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 67(1):27, 1973;
141. El-Adhami B.: "Isolation of *Leishmania* from a black rat in the Baghdad area, Iraq". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 25(5):759-61, 1976;
142. El-On J., Jacobs G.P., Witztum E., Greenblatt C.L.: "Development of topical treatment for cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in experimental animals". *Antimicrob. Agents Chemother.*, 26(5):745-51, 1984;
143. Eltoun I.A., Zijlstra E.E., Ali M.S., Ghalib H.W., Satti M.M., Eltoun B., el-Hassan A.M.: "Congenital kala-azar and leishmaniasis in the placenta". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 46(1):57-62, 1992;
144. Evans T.G., Teixeira M.J., Mcauliffe I.T., Vasconcelos I.A.B., Vasconcelos A.W., Sousa A. Q., Lima J.W.O., Pearson R.D.: "Epidemiology of visceral leishmaniasis in Northeast Brazil". *J. Infect. Dis.*, 166:1124-32, 1992;
145. Evans D.A.: "In vitro cultivation and biological cloning of *Leishmania*". In "Methods in molecular biology, Vol. 21. Protocols in molecular parasitology", ed. J.E. Hyde, Humana Press Inc, Totowa, NJ:29-41, 1993;
146. Favati V., Macchioni F., Mancianti F.: "Epidemiologia della Leishmaniosi in Toscana". *Prog. Vet.*, anno LV-23, 2000;

147. Fernández-Bellon H., Solano-Gallego L., Rodríguez A., Rutten V.P., Hoek A., Ramis A., Alberola J., Ferrer L.: "Comparison of three assays for the evaluation of specific cellular immunity to *Leishmania infantum* in dogs". Vet. Immunol. Immunopathol., 107(1-2):163-9, 2005;
148. Fernández-Pérez F.J., Méndez S., de la Fuente C., Gómez-Muñoz M.T., Cuquerella M., Alunda J.M.: "Short report: improved diagnosis and follow-up of canine leishmaniasis using amastigote-based indirect immunofluorescence". Am. J. Trop. Med. Hyg., 61(4):652-3, 1999;
149. Fernández-Pérez F.J., Méndez S., de la Fuente C., Cuquerella M., Gómez M.T., Alunda J.M.: "Value of Western blotting in the clinical follow-up of canine leishmaniasis". J. Vet. Diagn. Invest., 11(2):170-3, 1999;
150. Fernández-Pérez F.J., Gómez-Muñoz M.T., Méndez S., Alunda J.M.: "*Leishmania*-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs". Acta Trop., 86(1):83-91, 2003;
151. Ferrer L., Aisa M.J., Roura X., Portús M.: "Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis". Vet. Rec., 136(20):514-6, 1995;
152. Ferrer L.: "Stato dell'arte della leishmaniosi canina: un modello che cambia". In "Atti del 2° Congresso Internazionale Merial™", Riccione (RN), 17 giugno 2000, 67-70, 2000;
153. Ferrer L., Solano-Gallego L., Arboix M., Alberola J.: "Evaluation of the specific immune response in dogs infected by *Leishmania infantum*. In Thoday, K.L., Foil, C.S., Bond, R. (Eds.), Proceedings of the Fourth World Congress of Veterinary Dermatology, San Francisco, USA, Adv. Vet. Derm. 92-9, 2000;
154. Ferroglio E., Maroli M., Gastaldo S., Mignone W., Rossi L.: "Canine leishmaniasis, Italy". Emerg. Infect. Dis., 11(10):1618-20, 2005;
155. Ferroglio E., Vitale F.: "Diagnosis of leishmaniosis: between old doubts and new uncertainties". Vet. Res. Commun., 30(Suppl. 1):35-8, 2006;
156. Ferroglio E., Romano A., Trisciuglio A., Poggi M., Ghiggi E., Sacchi P., Biglino A.: "Characterization of *Leishmania infantum* strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP". Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 100(7):636-41, 2006;
157. Ferroglio E.: Incontro Idexx™ sulla leishmaniosi canina - Firenze, 18 marzo 2007;
158. Ferroglio E., Poggi M., Trisciuglio A.: "Evaluation of 65% Permethrin Spot-on and Deltamethrin-impregnated Collars for Canine *Leishmania infantum* Infection Prevention". Zoonoses Public Health., 55(3):145-8, 2008;
159. Figueiró-Filho E.A., Duarte G., El-Beitune P., Quintana S.M., Lemos Maia T.: "Visceral leishmaniasis (kala-azar) and pregnancy". Infect. Dis. Obstet. Gynecol., 12(1):31-40, 2004;
160. Fillola G., Corberand J.X., Laharrague P.F., Levenes H., Massip P., Recco P.: "Peripheral intramonocytic leishmanias in an AIDS patient". J. Clin. Microbiol., 30(12):3284-5, 1992;
161. Fisa R., Gállego M., Riera C., Aisa M.J., Valls D., Serra T., de Colmenares M., Castillejo S., Portús M.: "Serologic diagnosis of canine leishmaniasis by dot-ELISA". J. Vet. Diagn. Invest., 9(1):50-5, 1997;
162. Fisa R., Gállego M., Castillejo S., Aisa M.J., Serra T., Riera C., Carrió J., Gállego J., Portús M.: "Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus". Vet. Parasitol., 83(2):87-97, 1999;

163. Fisa R., Riera C., Gállego M., Manubens J., Portús M.: "Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates". *Vet. Parasitol.*, 99(2):105-11, 2001;
164. Fitzgerald M.G., Hosking C.S.: "Cell structure and percent viability by a slide centrifuge technique". *J. Clin. Pathol.*, 35(2):191-4, 1982;
165. Foglia Manzillo V., Piantedosi D., Cortese L.: "Detection of *Leishmania infantum* in canine peripheral blood". *Vet. Rec.*, 156(5):151-2, 2005;
166. Foglia Manzillo V., Restucci B., Pagano A., Gradoni L., Oliva G.: "Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis". *Vet. Rec.*, 158(20):690-4, 2006;
167. Fondevila D., Vilafranca M., Ferrer L.: "Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis". *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 56(3-4):319-27, 1997;
168. Franceschi A., Merildi V., Guidi G., Mancianti F.: "Occurrence of *Leishmania* DNA in urines of dogs naturally infected with leishmaniasis". *Vet. Res. Commun.*, 31(3):335-41, 2007;
169. Franceschi A., Compagnoni F., Mancianti F.: "A simple duplex-PCR protocol for routine diagnosis and follow up of canine leishmaniasis." *Parassitologia*, 49(1-2):43-8, 2007;
170. Francino O., Altet L., Sánchez-Robert E., Rodriguez A., Solano-Gallego L., Alberola J., Ferrer L., Sánchez A., Roura X.: "Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis". *Vet. Parasitol.*, 37(3-4):214-21, 2006;
171. Gangneux J.P., Dullin M., Sulahian A., Garin Y.J., Derouin F.: "Experimental evaluation of second-line oral treatments of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*". *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43(1):172-4, 1999[1];
172. Gangneux J.P., Chau F., Sulahian A., Derouin F., Garin Y.J.: "Effects of immunosuppressive therapy on murine *Leishmania infantum* visceral leishmaniosis". *Eur. Cytokine Netw.*, 10(4):557-9, 1999[2];
173. García-Alonso M., Nieto C.G., Blanco A., Requena J.M., Alonso C., Navarrete I.: "Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system". *Parasite Immunol.*, 18(11):539-46, 1996;
174. García-Rodríguez J.A.: "Mastigophora". In "Microbiología y parasitología médica", A. Pumarola, A. Rodríguez-Torres, J.A. García-Rodríguez, G. Piédrola-Angulo, 2ª ed.:819-31, 1999;
175. Garnham P.C.C.: "The Leishmanias, with special reference of the role of animal reservoirs". *Am. Zool.*, 5:141-51, 1965;
176. Genchi C., Pietrobelli M.: "Canine leishmaniosis: an italian emergency". *Vet. Res. Commun.*, 30(Suppl. 1):29-30, 2006;
177. Ghazanfari T., Hassan ZM, Khamesipour A "Enhancement of peritoneal macrophage phagocytic activity against *Leishmania major* by garlic (*Allium sativum*) treatment." *J. Ethnopharmacol.*, 103(3):333-7, 2006;
178. Giauffret A., Sanchis R., Vitu C.: "Les examens de laboratoire dans la leishmaniose canine. I. Application au diagnostic, au pronostic et au contrôle du traitement dans la maladie naturelle". *Revue Méd. Vét.*, 127(6):913-30, 1976;
179. Giffoni J.H., de Almeida C.E., dos Santos S.O., Ortega V.S., de Barros A.T.: "Evaluation of 65% permethrin spot-on for prevention of canine visceral leishmaniasis: effect on disease

- prevalence and the vectors (*Diptera: Psychodidae*) in a hyperendemic area". Vet. Ther., 3(4):485-92, 2002;
180. Ginel P.J., Lucena R., López R., Molleda J.M.: "Use of allopurinol for maintenance of remission in dogs with leishmaniasis". J. Small Anim. Pract., 39(6):271-4, 1998;
 181. Giraudel J.M., Pagès J.P., Guelfi J.F.: "Monoclonal gammopathies in the dog: a retrospective study of 18 cases (1986-1999) and literature review". J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 38(2):135-47, 2002;
 182. Giunchetti R.C., Martins-Filho O.A., Carneiro C.M., Mayrink W., Marques M.J., Tafuri W.L., Corrêa-Oliveira R., Reis A.B.: "Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis". Vet. Immunol. Immunopathol., 121(1-2):23-33, 2008[1];
 183. Giunchetti R.C., Mayrink W., Carneiro C.M., Corrêa-Oliveira R., Martins-Filho O.A., Marques M.J., Tafuri W.L., Reis A.B.: "Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis". Res. Vet. Sci., 84(2):269-77, 2008[2];
 184. Gomes A.H., Ferreira I.M., Lima M.L., Cunha E.A., Garcia A.S., Araújo M.F., Pereira-Chiocola V.L.: "PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine Leishmaniasis". Vet. Parasitol., 144(3-4):234-41, 2007;
 185. Gomez-Ochoa P., Gascon F.M., Lucientes J., Larraga V., Castillo J.A.: "Lactating females Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) show protection against experimental *Leishmania infantum* infection". Vet. Parasitol., 116(1):61-4, 2003;
 186. Gómez-Ochoa P., Castillo J.A., Gascón M., Zarate J.J., Alvarez F., Couto C.G.: "Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: A clinical trial". Vet. J., in stampa (doi:10.1016/j.tvjl.2007.09.014), 2007;
 187. Gosh K.N., Gosh D.K., De A., Bhattacharya A.: "Biology of *P. argentipes* Annandale and Brunetti and *P. papatasi* (Scopoli) in the laboratory". Ann. Parasitol. Hum. Comp., 67:55-61, 1992;
 188. Gradoni L., Gramiccia M., Mancianti F., Pieri S.: "Studies on canine leishmaniasis control. 2. Effectiveness of control measures against canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy". Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 82(4):568-71, 1988;
 189. Gramiccia M.: "Eziologia e ciclo biologico". In "La leishmaniosi canina", ed. SCIVAC (Ev. Srl), 1-10, 1989;
 190. Gramiccia M., Di Muccio T., Marinucci M.: "Identificazione del parassita nella sorveglianza dei casi importati di leishmaniosi in Italia". Parassitologia, 46(1-2):207-10, 2004;
 191. Grogl M., Daugirda J.L., Hoover D.L., Magill A.J., Berman J.D.: "Survivability and infectivity of viscerotropic *Leishmania tropica* from Operation Desert Storm participants in human blood products maintained under blood bank conditions". Am. J. Trop. Med. Hyg., 49(3):308-15, 1993;
 192. Guarga J.L., Moreno J., Lucientes J., Gracia M.J., Peribáñez M.A., Alvar J., Castillo J.A.: "Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells". Res. Vet. Sci., 69(3):249-53, 2000;
 193. Guarga J.L., Moreno J., Lucientes J., Gracia M.J., Peribáñez M.A., Castillo J.A.: "Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis". Vet. Immunol. Immunopathol., 88(1-2):13-20, 2002;

194. Halbig P., Hodjati M.H., Mazloumi-Gavvani A.S., Mohite H., Davies C.R.: "Further evidence that deltamethrin-impregnated collars protect domestic dogs from sandfly bites". *Med. Vet. Entomol.*, 14(2):223-6, 2000;
195. Hall L.R., Titus R.G.: "Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production". *J. Immunol.*, 155(7):3501-6, 1995;
196. Handman E.: "Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development". *Clin. Microbiol. Rev.*, 14(2):229-43, 2001;
197. Hantson P., Luyasu S., Haufried V., Lambert M.: "Antimony excretion in a patient with renal impairment during meglumine antimoniate therapy". *Pharmacotherapy*, 20(9):1141-3, 2000;
198. Harrus S., Waner T., Avidar Y., Bogin E., Peh H., Bark H.: "Serum protein alterations in canine ehrlichiosis". *Vet. Parasitol.*, 66(3-4):241-9, 1996;
199. Harvey J.W.: "Disorders of bone marrow". In "Atlas of veterinary hematology", W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, New York, St. Louis, Sydney, Toronto, 125-61, 2001;
200. Haskó G., Szabó C., Németh Z.H., Kvetan V., Pastores S.M., Vizi E.S.: "Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice". *J. Immunol.*, 157(10):4634-40, 1996;
201. Haskó G., Németh Z.H., Vizi E.S., Salzman A.L., Szabó C.: "An agonist of adenosine A3 receptors decreases interleukin-12 and interferon-gamma production and prevents lethality in endotoxemic mice". *Eur. J. Pharmacol.*, 358(3):261-8, 1998;
202. Henderson L.H.: "Clinical observations on kala-azar in the Fung province of the Sudan". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 31(2):179-90, 1937;
203. Herrer A., Christensen H.A.: "*Leishmania braziliensis* in the Panamanian two-toed sloth, *Choloepus hoffmanni*". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29(6):1196-200, 1980;
204. Hervás Rodríguez J., Mozos E., Méndez A., Pérez J., Gómez-Villamandos J.C.: "*Leishmania* infection of canine skin fibroblasts in vivo". *Vet. Pathol.*, 33(4):469-73, 1996;
205. Herwaldt B.L.: "Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures". *Clin. Microbiol. Rev.*, 14(4):659-88, 2001;
206. Hide M., Singh R., Kumar B., Bañuls A.L., Sundar S.: "A microculture technique for isolating live *Leishmania* parasites from peripheral blood of visceral leishmaniasis patients". *Acta Trop.*, 102(3):197-200, 2007;
207. Hill J.O.: "Pathophysiology of experimental leishmaniasis: pattern of development of metastatic disease in the susceptible host". *Infect. Immun.*, 52(2):364-9, 1986;
208. Horton M.R., Burdick M.D., Strieter R.M., Bao C., Noble P.W.: "Regulation of hyaluronan-induced chemokine gene expression by IL-10 and IFN-gamma in mouse macrophages". *J. Immunol.*, 160(6):3023-30, 1998;
209. Hurd H.: "Manipulation of medically important insect vectors by their parasites". *Annu. Rev. Entomol.*, 48:141-61, 2003;
210. Ikeda-Garcia F.A., Lopes R.S., Ciarlini P.C., Marques F.J., Lima V.M., Perri S.H., Feitosa M.M.: "Evaluation of renal and hepatic functions in dogs naturally infected by visceral leishmaniasis submitted to treatment with meglumine antimoniate". *Res. Vet. Sci.* 83(1):105-8, 2007;

211. Iqbal S.M., Murty J.G., Banerjee P.K., Vishwanathan K.A.: "Metronidazole ototoxicity. Report of two cases". J. Laryngol. Otol., 113:355-7, 1999;
212. Izri M.A., Deniau M., Brière C., Rivollet D., Petithory J.C., Houin R., Rousset J.J.: "Leishmaniasis in AIDS patients: results of leukocytoconcentration, a fast biological method of diagnosis". Bull. World Health Organ., 74(1):91-3, 1996;
213. Kallel K., Ammari L., Kaouech E., Belhadj S., Anane S., Kilani B., Chaker E.: "Portage asymptomatique de *Leishmania infantum* chez de malades tunisiens infectés par le VIH". Pathol. Biol., 55(10):521-4, 2007;
214. Kamhawi S., Belkaid Y., Modi G., Rowton E., Sacks D.: "Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies". Science, 290:1351-4, 2000;
215. Kamhawi S.: "The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections". Microbes Infect., 2(14):1765-73, 2000;
216. Kamhawi S.: "The journey of *Leishmania* parasites within the digestive tract of phlebotomine sand flies". In "World Class Parasites: Volume 4 - Leishmania", ed. Jay P. Farrell, Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrech, London, 59-73, 2002;
217. Kamhawi S.: "Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?". Trends Parasitol., 22(9):439-4, 2006;
218. Kane M.M., Mosser D.M.: "The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis". J. Immunol., 166(2):1141-7, 2001;
219. Kaneko J.J.: "Serum proteins and dysproteinemias". In "Clinical biochemistry of domestic animals", ed. J.J. Kaneko, J.W. Harvey, M.L. Bruss, 5th ed., Elsevier:117-38, 1997;
220. Karp C.L., el-Safi S.H., Wynn T.A., Satti M.M., Kordofani A.M., Hashim F.A., Hag-Ali M., Neva F.A., Nutman T.B., Sacks D.L.: "In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma". J. Clin. Invest., 91(4):1644-8, 1993;
221. Kasap O.E., Alten B.: "Laboratory estimation of degree-day developmental requirements of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae)". J. Vector Ecol., 30(2):328-33, 2005;
222. Kassa-Kelembho E., Kobangue L., Huerre M., Morvan J.M.: "Premier cas de leishmaniose cutanée d'importation a Bangui en Republique Centraficane: efficacité du metronidazole". Méd. Trop., 63(6):597-600, 2003;
223. Keithly J.S., Langreth S.G.: "Inefficacy of metronidazole in experimental infections of *Leishmania donovani*, *L. mexicana*, and *Trypanosoma brucei brucei*". Am. J. Trop. Med. Hyg., 32(3):485-96, 1983;
224. Kenney R.T., Sacks D.L., Gam A.A., Murray H.W., Sundar S.: "Splenic cytokine responses in Indian kala-azar before and after treatment". J. Infect. Dis., 177(3):815-8, 1998;
225. Killick-Kendrick R., Rioux J.A., Bailly M., Guy M.W., Wilkes T.J., Guy F.M., Davidson I., Knechtli R., Ward R.D., Guilvard E., Périère J., Dubois H.: "Ecology of leishmaniasis in the south of France. 20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the Cévennes". Ann. Parasitol. Hum. Comp., 59(6):555-72, 1984;
226. Killick-Kendrick R., Wilkes T.J., Bailly M., Bailly I., Righton L.A.: "Preliminary field observations on the flight speed of a phlebotomine sandfly". Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 80(1):138-42, 1986;

227. Killick-Kendrick R., Killick-Kendrick M., Focheux C., Dereure J., Puech M.P., Cadiergues M.C.: "Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis". *Med. Vet. Entomol.*, 11(2):105-11, 1997;
228. Killick-Kendrick R.: "Phlebotomine sand flies: Biology and control". In "World Class Parasites: Volume 4 - Leishmania", ed. Jay P. Farrell, Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrech, London, 33-43, 2002;
229. Killick-Kendrick R., Rioux J.A.: "Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural life-cycle of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus ariasi*". *Parassitologia*, 44(1-2):67-71, 2002;
230. Knapp D.W., Waters D.J., Schmidt B.R.: "Tumori dell'apparato urogenitale e delle ghiandole mammarie". In "Trattato di clinica medica veterinaria. Malattie del cane e del gatto", ed. S.J. Ettinger, E.C. Feldman, 2^a ed. italiana, Antonio Delfino Editore, Roma:545, 2002;
231. Knowles R., Das Gupta B.M.: "The diagnosis of kala-azar by examination of thick blood film". *Indian Med. Gazette*, 59:438-40, 1924;
232. Koutinas A.F., Polizopoulou Z.S., Saridomichelakis M.N., Argyriadis D., Fytianou A., Plevraki K.G.: "Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996)". *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 35(5):376-83, 1999;
233. Koutinas A.F., Saridomichelakis M.N., Mylonakis M.E., Leontides L., Polizopoulou Z., Billinis C., Argyriadis D., Diakou N., Papadopoulos O.: "A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis". *Vet. Parasitol.*, 98(4):247-61, 2001;
234. Kramer L., Calvi L.E., Grandi G.: "Immunity to *Leishmania infantum* in the dog: resistance and disease". *Vet. Res. Commun.*, 30(Suppl. 1):53-7, 2006;
235. Kreutzer R.D., Yemma J.J., Grogl M., Tesh R.B., Martin T.I.: "Evidence of sexual reproduction in the protozoan parasite *Leishmania* (*Kinetoplastida: Trypanosomatidae*)". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 51(3):301-7, 1994;
236. Kumar N., Pandey K., Das V.N., Sinha P.K., Topno R.K., Verma N., Lal C.S., Das P., Bhattacharya S.K.: "Miltefosine in the treatment of a case of visceral leishmaniasis with renal dysfunction". *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 101(7):649-51, 2007;
237. Kwok S., Higuchi R.: "Avoiding false positives with PCR". *Nature*, 339(6221):237-8, 1989;
238. Lachaud L., Dereure J., Chabbert E., Reynes J., Mauboussin J.M., Oziol E., Dedet J.P., Bastien P.: "Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral Leishmaniasis, with special reference to AIDS patients". *J. Clin. Microbiol.*, 38(1):236-40, 2000;
239. Lachaud L., Chabbert E., Dubessay P., Reynes J., Lamothe J., Bastien P.: "Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood". *J. Clin. Microbiol.*, 39(2):613-7, 2001;
240. Lachaud L., Marchergui-Hammami S., Chabbert E., Dereure J., Dedet J.P., Bastien P.: "Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis". *J. Clin. Microbiol.*, 40(1):210-5, 2002;
241. Laguna del Estal P., Moya M.S., Martín T., Lucero M.J., Salgado R.: "Metronidazole therapy for visceral leishmaniasis". *Clin. Infect. Dis.*, 19(6):1161-2, 1994;
242. Lainson R., Bray R.S.: "Transmission of *Leishmania mexicana* among laboratory hamsters in the absence of an insect vector". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 58(4):287, 1964;

243. Lainson R., Southgate B.A.: "Mechanical transmission of *Leishmania mexicana* by *Stomoxys calcitrans*". Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 59(6):716, 1965;
244. Lamothe J.: "Essai du traitement de la leishmaniose canine par l'amphotéricine B (39 cas)". Prat. Méd. Chir. Anim. Comp., 32:133-41, 1997;
245. Lamothe J.: "Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis". J. Small. Anim. Pract., 42(4):170-5, 2001;
246. Lamothe J.: "La leishmaniose canine: limites diagnostiques de la sérologie à partir de deux cas cliniques". Prat. Méd. Chir. Anim. Comp., 42:1-5, 2002;
247. Lanotte G., Rioux J.A., Perieres J., Vollhardt Y.: "Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 10. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique". Ann. Parasitol. Hum. Comp., 54(3):277-295, 1979;
248. Laskay T., van Zandbergen G., Solbach W.: "Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: Apoptosis as infection-promoting factor". Immunobiology, 213(3-4):183-91, 2008;
249. Leandro C., Santos-Gomes G.M., Campino L., Romão P., Cortes S., Rolão N., Gomes-Pereira S., Riça Capela M.J., Abranches P.: "Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis". Vet. Immunol. Immunopathol., 79(3-4):273-84, 2001;
250. le Fichoux Y., Quaranta J.F., Aufeuve J.P., Lelievre A., Marty P., Suffia I., Rousseau D., Kubar J.: "Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France". J. Clin. Microbiol., 37(6):1953-7, 1999;
251. Lehane M.J.: "The Biology of Blood-Sucking in Insects". Cambridge University Press, New York, 235-7, 2005;
252. Leishman W.B.: "On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India". Br. Med. J., May 30:1252-4, 1903;
253. Levy E., Mylonakis M.E., Saridomichelakis M.N., Polizopoulou Z.S., Psychogios V., Koutinas A.F.: "Nasal and oral masses in a dog". Vet. Clin. Pathol., 35(1):115-8, 2006;
254. Lewis D.J.: "The biology of Phlebotomidae in relation to leishmaniasis". Annu. Rev. Entomol., 19:363-84, 1974;
255. Liarte D.B., Mendonça I.L., Luz F.C., Abreu E.A., Mello G.W., Farias T.J., Ferreira A.F., Millington M.A., Costa C.H.: "QBC for the diagnosis of human and canine american visceral leishmaniasis: preliminary data". Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 34(6):577-81, 2001;
256. Lima W.G., Michalick M.S., de Melo M.N., Tafuri W.L., Tafuri Wg.L.: "Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes". Acta Trop., 92(1):43-53, 2004;
257. Limoncu M.E., Balcioglu I.C., Yereli K., Ozbel Y., Ozbilgin A.: "A new experimental in vitro culture medium for cultivation of *Leishmania* species". J. Clin. Microbiol., 35(9):2430-1, 1997;
258. Liu L., Benten W.P., Wang L., Hao X., Li Q., Zhang H., Guo D., Wang Y., Wunderlich F., Qiao Z.: "Modulation of *Leishmania donovani* infection and cell viability by testosterone in bone marrow-derived macrophages: signaling via surface binding sites". Steroids, 70(9):604-14, 2005;

259. Liu L., Wang L., Zhao Y., Wang Y., Wang Z., Qiao Z.: "Testosterone attenuates p38 MAPK pathway during *Leishmania donovani* infection of macrophages". *Parasitol. Res.*, 99(2):189-93., 2006;
260. Lo Y.M.D., Mehal W.Z., Fleming K.A.: "False-positive results and the polymerase chain reaction". *Lancet*, 2(8612):679, 1988;
261. Lo Y.M.D., Chan K.C.A.: "Introduction to the Polymerase Chain Reaction". In "Clinical applications of PCR", 2nd ed., ed. Y.M.D. Lo, R.W.K. Chiu, K.C.A. Chan, Humana Press, Totowa, NJ:1-10, 2006;
262. Long P.I.: "Cutaneous leishmaniasis treated with metronidazole". *J.A.M.A.*, 223(12):1378-9, 1973;
263. López-Vélez R., Laguna F., Alvar J., Pérez-Molina J.A., Molina R., Martinez P., Villarrubia J.: "Parasitic culture of buffy coat for diagnosis of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients". *J. Clin. Microbiol.*, 33(4):937-9, 1995;
264. Lynn M.A., McMaster W.R.: "*Leishmania*: conserved evolution - diverse diseases". *Trends Parasitol.*, 24(3):103-5, 2008;
265. Maia C., Ramada J., Cristóvão J.M., Gonçalves L., Campino L.: "Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues". *Vet. J.*, in stampa (doi:10.1016/j.tvjl.2007.08.009), 2007;
266. Maingon R.D., Ward R.D., Hamilton J.G., Bauzer L.G., Peixoto A.A.: "The *Lutzomyia longipalpis* species complex: does population sub-structure matter to *Leishmania* transmission?". *Trends Parasitol.* 24(1):12-7, 2008;
267. Mancianti F., Meciani N.: "Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis". *Am. J. Vet. Res.*, 49(8):1409-11, 1988;
268. Mancianti F., Gramiccia M., Gradoni L., Pieri S.: "Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 82(4):566-7, 1988;
269. Mancianti F., Poli A., Bionda A.: "Analysis of renal immune-deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results". *Parassitologia*, 31(2-3):213-30, 1989;
270. Mancianti F., Mignone W., Galastri F.: "Serologic survey for leishmaniasis in free-living red foxes (*Vulpes vulpes*) in Italy". *J. Wildl. Dis.*, 30(3):454-6, 1994;
271. Mancianti F., Sozzi S.: "Isolation of *Leishmania* from a newborn puppy". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 89(4):402, 1995;
272. Mancianti F., Bizzeti M.: "Terapia della leishmaniosi canina". *Obiett. Doc. Vet.*, 5:7-17, 2000;
273. Mancianti F.: "Diagnosi sierologica della leishmaniosi canina". In "Atti Incontro SIDEV", 25 febbraio 2001;
274. Mancianti F.: "Leishmaniosi felina: quale ruolo epidemiologico?". *Parassitologia*, 46(1-2):203-6, 2004;
275. Mancianti F., Franceschi A.: "Canine leishmaniasis: parasitological follow-up of the treated subject". *Vet. Res. Commun.*, 30(Suppl. 1):45-7, 2006;
276. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R.: "Principles and Practice of Infectious Diseases". 6th ed., Elsevier, 2005;

277. Manna L., Reale S., Viola E., Vitale F., Manzillo V.F., Michele P.L., Caracappa S., Gravino A.E.: "*Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs". *Vet. Parasitol.*, 142(3-4):271-80, 2006;
278. Manson-Bahr P.E.C., Heisch R.B.: "Studies in leishmaniasis in East Africa. III. Clinical features and treatment". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 50(5):465-71, 1956;
279. Manson-Bahr P.E.C.: "East African kala-azar with special reference to the pathology, prophylaxis and treatment". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 53(2):123-37, 1959;
280. Manson-Bahr P.E.C., Southgate P.A., Harvey A.E.C.: "Development of kala-azar in man after inoculation with a *Leishmania* from a Kenya sandfly". *Br. Med. J.*, 1:1208-10, 1963;
281. Maroli M., Mizzon V., Siragusa C., D'Orazi A., Gradoni L.: "Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy". *Med. Vet. Entomol.*, 15(4):358-63, 2001;
282. Maroli M., Pennisi M.G., Di Muccio T., Khoury C., Gradoni L., Gramiccia M.: "Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*". *Vet. Parasitol.*, 145(3-4):357-60, 2007;
283. Maroli M., Rossi L., Baldelli R., Capelli G., Ferroglio E., Genchi C., Gramiccia M., Mortarino M., Pietrobelli M., Gradoni L.: "The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors". *Trop. Med. Int. Health.*, 13(2):256-64, 2008;
284. Martinez J.E., Alba, Arias L., Escobar M.A., Saravia N.G.: "Haemoculture of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from two cases of mucosal leishmaniasis: re-examination of haematogenous dissemination". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 86(4):392-4, 1992;
285. Martínez P., de la Vega E., Laguna F., Soriano V., Puente S., Moreno V., Sentchordi M.J., García-Aguado C., González-Lahoz J.: "Diagnosis of visceral leishmaniasis in HIV-infected individuals using peripheral blood smears". *AIDS*, 7(2):227-30, 1993;
286. Martinez-Subiela S., Tecles F., Eckersall P.D., Cerón J.J.: "Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis". *Vet. Rec.*, 150(8):241-4, 2002;
287. Mary C., Faraut F., Drogoul M.P., Xeridat B., Schleinitz N., Cuisenier B., Dumon H.: "Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 75(5):858-63, 2006;
288. Masramon J., Aubia J., Lloveras J., Llorach I., Llorach M.: "Co-trimoxazole for leishmaniasis-or metronidazole?". *Lancet*, 1(8221):669, 1981;
289. Masucci M., De Majo M., Contarino R.B., Borruto G., Vitale F., Pennisi M.G.: "Canine leishmaniasis in the newborn puppy". *Vet. Res. Commun.*, 27(Suppl. 1):771-4, 2003;
290. Mathis A., Deplazes P.: "PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs". *J. Clin. Microbiol.*, 33(5):1145-9, 1995;
291. Maurya R., Singh R.K., Kumar B., Salotra P., Rai M., Sundar S.: "Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assessment of cure". *J. Clin. Microbiol.*, 43(7):3038-41, 2005;
292. Mazloumi-Gavvani A.S., Hodjati M.H., Mohite H., Davies C.R.: "Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matchedcluster randomised trial". *Lancet*, 360(9330):374-9, 2002;

293. Mbow M.L., Bleyenbergh J.A., Hall L.R., Titus R.G.: "*Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*". J. Immunol., 161(10):5571-7, 1998;
294. McDougald L.R., Roberson E.L.: "Farmaci antiprotozoi". In "Farmacologia e terapeutica veterinaria", N.H. Booth e L.E. McDonald, 1ª ed. italiana, EMSI, Roma, 1060-1, 1991;
295. McGrotty Y., Tennant K.: "Alterazioni delle proteine plasmatiche". In "Gli esami di laboratorio", ed. E. Villiers, L. Blackwood, UTET, Torino:109-21, 2006;
296. McFarlane E., Perez C., Charmoy M., Allenbach C., Carter K.C., Alexander J., Tacchini-Cottier F.: "Neutrophils contribute to the development of a protective immune response during the onset of infection with *Leishmania donovani*". Infect. Immun., 76(2):532-41, 2008;
297. McMillan B.: "Leishmaniasis in the Sudan Republic. 22. *Leishmania hoogstraali* sp. n. in the gecko". J. Parasitol., 51(3):336-9, 1965;
298. Medrano F.J., Cañavate C., Leal M., Rey C., Lissen E., Alvar J.: "The role of serology in the diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type-1". Am. J. Trop. Med. Hyg., 59(1):155-62, 1998;
299. Meinecke C.K., Schottelius J., Oskam L., Fleischer B.: "Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child". Pediatrics., 104(5):e65, 1999;
300. Mehlhorn H. (ed.): "Encyclopedia of Parasitology". 3th ed., Springer, 696-711; 1130; 1258-9; 2008;
301. Michalsky E.M., Rocha M.F., da Rocha Lima A.C., França-Silva J.C., Pires M.Q., Oliveira F.S., Pacheco R.S., dos Santos S.L., Barata R.A., Romanha A.J., Fortes-Dias C.L., Dias E.S.: "Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies". Vet. Parasitol., 147(1-2):67-76, 2007;
302. Miralles G.D., Stoeckle M.Y., McDermott D.F., Finkelman F.D., Murray H.W.: "Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis". Infect. Immun., 62(3):1058-63, 1994;
303. Miranda S., Martorell S., Costa M., Ferrer L., Ramis A.: "Characterization of circulating lymphocyte subpopulations in canine leishmaniasis throughout treatment with antimonials and allopurinol". Vet. Parasitol., 144(3-4):251-60, 2007;
304. Miret J., Nascimento E., Sampaio W., França J.C., Fujiwara R.T., Vale A., Dias E.S., Vieira E., Costa R.T., Mayrink W., Neto A.C., Reed S.: "Evaluation of an immunochemotherapeutic protocol constituted of N-methyl meglumine antimoniate (Glucantime®) and the recombinant Leish-110f®+MPL-SE® vaccine to treat canine visceral leishmaniasis". Vaccine, 26(12):1585-94, 2008;
305. Miró G., Gálvez R., Mateo M., Montoya A., Descalzo M.A., Molina R.: "Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog". Vet. Parasitol., 143(3-4):375-9, 2007;
306. Mittra B., Saha A., Chowdhury A.R., Pal C., Mandal S., Mukhopadhyay S., Bandyopadhyay S., Majumder H.K.: "Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis". Mol. Med., 6(6):527-41, 2000;
307. Mohebbi M., Taran M., Zarei Z.: "Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination". Vet. Parasitol., 121(3-4):239-45, 2004;

308. Molina R., López-Vélez R., Gutiérrez-Solar B., Jiménez I., Alvar J.: "Isolation of *Leishmania infantum* from the blood of a patient with AIDS using sandflies". Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 86(5):516, 1992;
309. Molina R., Miró G., Gálvez R., Nieto J., Descalzo M.A.: "Evaluation of a spray of permethrin and pyriproxyfen for the protection of dogs against *Phlebotomus perniciosus*". Vet. Rec., 159(7):206-9, 2006;
310. Moreira M.A., Luvizotto M.C., Garcia J.F., Corbett C.E., Laurenti M.D.: "Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs". Vet. Parasitol., 145(3-4):245-52, 2007;
311. Moreno J., Nieto J., Chamizo C., González F., Blanco F., Barker D.C., Alvar J.: "The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy". Vet. Immunol. Immunopathol., 71(3-4):181-95, 1999;
312. Moreno J., Alvar J.: "Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model". Trends Parasitol., 18(9):399-405, 2002;
313. Moreno P.: "Evaluation of secondary haemostasis in canine leishmaniasis". Vet. Rec., 144(7):169-71, 1999;
314. Morillas F., Rabasco F.S., Ocaña J., Martínez-Sánchez J., Ocaña-Wielmi J., Acedo C., Sanchiz-Martin M.C.: "Leishmaniosis in the focus of Axarquía region, Málaga province, Southern Spain: a survey of the human, dog and vector". Parasitol. Res., 82:469-70, 1996;
315. Moritz A., Steuber S., Greiner M.: "Clinical follow-up examination after treatment of canine leishmaniasis". Tokai J. Exp. Clin. Med., 23(6):279-83, 1999;
316. Mortarino M., Franceschi A., Mancianti F., Bazzocchi C., Genchi C., Bandi C.: "PCR quantitativa nella diagnosi di *Leishmania*". Parassitologia, 46(1-2):163-7, 2004;
317. Mozos E., Pérez J., Day M.J., Lucena R., Ginel P.J.: "Leishmaniosis and generalized demodicosis in three dogs: a clinicopathological and immunohistochemical study". J. Comp. Pathol., 120(3):257-68, 1999;
318. Muniaraj M., Lal C.S., Kumar S., Sinha P.K., Das P.: "Milk of cow (*Bos taurus*), buffalo (*Bubalus bubalis*), and goat (*Capra hircus*): a better alternative than fetal bovine serum in media for primary isolation, in vitro cultivation, and maintenance of *Leishmania donovani* promastigotes". J. Clin. Microbiol., 45(4):1353-6, 2007;
319. Murphy K.J., Bong A.C.: "Co-trimoxazole for systemic leishmaniasis". Lancet, 1(8215):323-4, 1981;
320. Mylonakis M.E., Papaioannou N., Saridomichelakis M.N., Koutinas A.F., Billinis C., Kontos V.I.: "Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*". Vet. Clin. Pathol., 34(3):243-7, 2005;
321. Napier L.E., Das Gupta C.R.: "The value of a provocative action of a pentavalent antimony in the diagnosis of kala-azar". Trop. Dis. Bull., 27:607, 1930;
322. Natale A.: "La leishmaniosi in Italia". Obiett. Doc. Vet., 12:23-8, 2004;
323. Neogy A.B., Vouldoukis I., da Costa J.M., Monjour L.: "Exploitation of parasite-derived antigen in therapeutic success against canine visceral leishmaniosis. Veterinary Group of Lupino". Vet. Parasitol., 54(4):367-73, 1994;
324. Nieto C.G., Barrera R., Habela M.A., Navarrete I., Molina C., Jiménez A., Serrera J.L.: "Changes in the plasma concentrations of lipids and lipoprotein fractions in dogs infected with *Leishmania infantum*". Vet. Parasitol., 44(3-4):175-82, 1992;

325. Nieto C.G., García-Alonso M., Requena J.M., Mirón C., Soto M., Alonso C., Navarrete I.: "Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis". Vet. Immunol. Immunopathol., 67(2):117-30, 1999;
326. Noli C.: "La leishmaniosi del cane". Waltham Focus, 9(2):16-24, 1999;
327. Noli C., Auxilia S.T.: "Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. Vet. Dermatol., 16(4):213-32, 2005;
328. Nunes C.M., Lima V.M., Paula H.B., Perri S.H., Andrade A.M., Dias F.E., Burattini M.N.: "Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil". Vet. Parasitol., 153(1-2):19-23, 2008;
329. Nuwayri-Salti N., Mu'Atassem D., Salman S., Izzedine N., Kibbi A.G.: "Chronic cutaneous leishmaniasis: *Leishmania* parasites in blood". Int. J. Dermatol., 31(8):562-4, 1992;
330. Nuwayri-Salti N., Salman S., Shahin N.M., Malak J.: "*Leishmania donovani* invasion of the blood in a child with dermal leishmaniasis". Ann. Trop. Paediatr., 19(1):61-4, 1999;
331. Nuzum E., White F. 3rd, Thakur C., Dietze R., Wages J., Grogl M., Berman J.: "Diagnosis of symptomatic visceral leishmaniasis by use of the polymerase chain reaction on patient blood". J. Infect. Dis., 171(3):751-4, 1995;
332. O'Garra A., Vieira P.: "T_H1 cells control themselves by producing interleukin-10". Nat. Rev. Immunol., 7(6):425-8, 2007;
333. Oliva G., Gradoni L., Ciaramella P., De Luna R., Cortese L., Orsini S., Davidson R.N., Persechino A.: "Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*". J. Antimicrob. Chemother., 36(6):1013-9, 1995;
334. Oliva G., Cortese L., Ciaramella P., De Luna R.: "Trattamento terapeutico della leishmaniosi canina". Veterinaria, 10:115-27. 1996;
335. Oliva G., Gradoni L., Cortese L., Orsini S., Ciaramella P., Scalone A., de Luna R., Persechino A.: "Comparative efficacy of meglumine antimoniate and aminosidine sulphate, alone or in combination, in canine leishmaniasis". Ann. Trop. Med. Parasitol., 92(2):165-71, 1998;
336. Oliva G.: "Atti Aggiornamenti sulla leishmaniosi canina". Calenzano (FI), 3 febbraio 2002;
337. Oliva G., Foglia Manzillo V., Pagano A.: "Evoluzione dei protocolli terapeutici in corso di leishmaniosi canina". Parassitologia, 46(1-2):231-4, 2004;
338. Oliva G., Scalone A., Foglia Manzillo V., Gramiccia M., Pagano A., Di Muccio T., Gradoni L.: "Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons". J. Clin. Microbiol., 44(4):1318-22, 2006;
339. Oliva G., Crotti A., Maroli M., Roura X., Solano-Gallego L., Zatelli A.: "2. Classificazione". In "Leishmaniosi canina: linee guida su diagnosi, stadiazione, terapia, monitoraggio e prevenzione. Parte I". Veterinaria, A21(3):27, 2007;
340. Oliva G.: Incontro VirbacTM per la presentazione del Milteforan[®] - Firenze, 26 settembre 2007;
341. Osorio Y., Bonilla D.L., Peniche A.G., Melby P.C., Travi B.L.: "Pregnancy enhances the innate immune response in experimental cutaneous leishmaniasis through hormone-modulated nitric oxide production". J. Leukoc. Biol., in stampa (DOI:10.1189/jlb.0207130), 2008;

342. Otranto D., Paradies P., Sasanelli M., Leone N., de Caprariis D., Chirico J., Spinelli R., Capelli G., Brandonisio O.: "Recombinant K39 dipstick immunochromatographic test: a new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis". *J. Vet. Diagn. Invest.*, 17(1):32-7, 2005;
343. Otranto D., Paradies P., Lia R.P., Latrofa M.S., Testini G., Cantacessi C., Mencke N., Galli G., Capelli G., Stanneck D.: "Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area". *Vet. Parasitol.*, 144(3-4):270-8, 2007;
344. Paltrinieri S., Castagnano M., Crotti A., Fondati A., Gradoni L., Lubas G., Solano-Gallego L., Zatelli A.: "1. Approccio diagnostico". In "Leishmaniosi canina: linee guida su diagnosi, stadiazione, terapia, monitoraggio e prevenzione. Parte I". *Veterinaria*, A21(3):21-7, 2007;
345. Paradies P., Capelli G., Cafarchia C., de Caprariis D., Sasanelli M., Otranto D.: "Incidences of canine leishmaniasis in an endemic area of southern Italy". *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, 53(6):295-8, 2006;
346. Paraguai de Souza E., Esteves Pereira A.P., Machado F.C., Melo M.F., Souto-Padrón T., Palatnik M., Palatnik-de-Sousa C.B.: "Occurrence of *Leishmania donovani* parasitemia in plasma of infected hamsters". *Acta Trop.*, 80(1):69-75, 2001;
347. Paranhos-Silva M., Freitas L., Santos W.C., Grimaldi Jr. G., Pontes-De-Carvalho L.C., Oliveira-Dos-Santos A.A.: "Cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 55:39-44, 1996;
348. Paranhos-Silva M., Pontes-de-Carvalho L.C., de Sá Oliveira G.G., Nascimento E.G., dos-Santos W.L.: "Skin reactions to thimerosal and *Leishmania* in dogs from a leishmaniasis endemic area: it is better to keep them apart". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 96(5):679-81, 2001;
349. Passos V.M., Barreto S.M., Romanha A.J., Krettli A.U., Volpini A.C., Lima e Costa M.F.: "American cutaneous leishmaniasis: use of a skin test as a predictor of relapse after treatment". *Bull. World Health Organ.*, 78(8):968-74, 2000;
350. Pearson R.D., Uydess I.L., Chapman S.W., Steigbigel R.T.: "Interaction of human eosinophils with *Leishmania donovani*". *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 81(6):735-9, 1987;
351. Pearson R.D., Jeronimo S.M.B., de Q. Sousa A.: "Leishmaniasis". In "Principles and Practice of Clinical Parasitology". Ed. S.H. Gillespie, R.D. Pearson, John Wiley & Sons, LTD; 287-313, 2001;
352. Pennisi M.G.: "Chemioterapia della leishmaniosi canina: un capitolo aperto". In "Atti II Congresso Internazionale Merial™", 71-9, 2000;
353. Pennisi M.G., De Majo M., Masucci M., Britti D., Vitale F., Del Maso R.: "Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniosis with a combination of metronidazole and spiramycin". *Vet. Rec.*, 156(11):346-9, 2005;
354. Petithory J.C., Ardoin F., Ash L.R., Vandemeulebroucke E., Galeazzi G., Dufour M., Paugam A.: "Microscopic diagnosis of blood parasites following a cytoconcentration technique". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 57(6):637-42, 1997;
355. Pimenta P.F.P., Modi G.B., Pereira S.T., Shahabuddin M., Sacks D.L.: "A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut". *Parasitology*, 115:359-69, 1997;
356. Pinelli E., Killick-Kendrick R., Wagenaar J., Bernadina W., del Real G., Ruitenbergh J.: "Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*". *Infect. Immun.*, 62(1):229-35, 1994;

357. Pinelli E., van der Kaaij S.Y., Slappendel R., Fragio C., Ruitenbergh E.J., Bernadina W., Rutten V.P.: "Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction". *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 69(2-4):121-6, 1999;
358. Pirmez C., Coutinho S.G., Marzochi M.C., Nunes M.P., Grimaldi G. Jr.: "Canine American cutaneous leishmaniasis: a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro, Brazil". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 38(1):52-8, 1988;
359. Pizzirani S.: "Sintomatologia e segni clinici. Diagnosi clinica". In "La leishmaniosi canina", ed. SCIVAC (Ev. Srl):31-41, 1989;
360. Pizzirani S., Saponetto N.: "Diagnosi di laboratorio. Chimica clinica". In "La leishmaniosi canina", ed. SCIVAC (Ev. Srl):44-50, 1989[1];
361. Pizzirani S., Saponetto N.: "Diagnosi di laboratorio. Esami biotici". In "La leishmaniosi canina", ed. SCIVAC (Ev. Srl):53-7, 1989[2];
362. Pizzirani S., Mancianti F., Saponetto N., Degl'Innocenti R.: "Diagnosi di laboratorio. Esami sierologici". In "La leishmaniosi canina", ed. SCIVAC (Ev. Srl):50-3, 1989;
363. Pizzirani S.: "Protocollo terapeutico delle leishmaniosi canine". In "Prontuario Terapeutico veterinario", 3^a ed. SCIVAC:559-63, 2001;
364. Plevraki K., Koutinas A.F., Kaldrymidou H., Roumpies N., Papazoglou L.G., Saridomichelakis M.N., Savvas I., Leondides L.: "Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in Canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*)". *J. Vet. Intern. Med.*, 20(2):228-33, 2006;
365. Poli A., Abramo F., Mancianti F., Nigro M., Pieri S., Bionda A.: "Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study". *Nephron*, 57(4):444-52, 1991;
366. Poulin R.: "Parasite manipulation of vector behaviour". In "The behavioural ecology of parasites", ed. E.E. Lewis, J.F. Campbell, M.V.K. Sukhdeo, CABI Publishing, 259-81, 2002;
367. Pozio E., Gradoni L., Bettini S., Gramiccia M.: "Leishmaniasis in Tuscany (Italy). V. Further isolation of *Leishmania* from *Rattus rattus* in the province of Grosseto". *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 75 :393-5, 1981;
368. Prasad L.S., Sen S., Ganguly S.K.: "Renal involvement in kala-azar". *Indian J. Med. Res.*, 95:43-6, 1992;
369. Prasad R., Kumar R., Jaiswal B.P., Singh U.K.: "Miltefosine: an oral drug for visceral leishmaniasis". *Indian J. Pediatr.*, 71(2):143-4, 2004;
370. Prina E., Roux E., Mattei D., Milon G.: "*Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR". *Microbes Infect.*, 9(11):1307-15, 2007;
371. Puccini V.: "Guida alle malattie parassitarie degli animali domestici". Ed. Edagricole, 41-6, 1992;
372. Pugliese A.: "La Leishmaniosi del cane in Italia". *Prog. Vet.*, A.LVI(12):633-6, 2001;
373. Pumarola M., Brevik L., Badiola J., Vargas A., Domingo M., Ferrer L.: "Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs". *J. Comp. Pathol.*, 105(3):279-86, 1991;

374. Quinnell R.J., Courtenay O., Shaw M.A., Day M.J., Garcez L.M., Dye C., Kaye P.M.: "Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis". *J. Infect. Dis.*, 183(9):1421-4, 2001[1];
375. Quinnell R.J., Courtenay O., Davidson S., Garcez L., Lambson B., Ramos P., Shaw J.J., Shaw M.A., Dye C.: "Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs". *Parasitology*, 122(Pt 3):253-61, 2001[2];
376. Quinnell R.J., Courtenay O., Garcez L.M., Kaye P.M., Shaw M.A., Dye C., Day M.J.: "IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis". *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 91(3-4):161-8, 2003;
377. Radjame K., Srinivasan R., Dhanda V.: "Oviposition response of phlebotomid sandfly *Phlebotomus papatasi* to soil bacteria isolated from natural breeding habitats". *Ind. J. Exp. Biol.*, 35:59-61, 1997;
378. Ramos Franco A. M.: "First World Congress on Leishmaniasis - World Leish 1". *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 92(6):867-70, 1997;
379. Reale S., Maxia L., Vitale F., Glorioso N.S., Caracappa S., Vesco G.: "Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood". *J. Clin. Microbiol.*, 37(9):2931-5, 1999;
380. Reis A.B., Martins-Filho O.A., Teixeira-Carvalho A., Carvalho M.G., Mayrink W., França-Silva J.C., Giunchetti R.C., Genaro O., Corrêa-Oliveira R.: "Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis". *Res. Vet. Sci.*, 81(1):68-75, 2006[1];
381. Reis A.B., Teixeira-Carvalho A., Giunchetti R.C., Guerra L.L., Carvalho M.G., Mayrink W., Genaro O., Corrêa-Oliveira R., Martins-Filho O.A.: "Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*". *Clin. Exp. Immunol.*, 146(2):303-11, 2006[2];
382. Reithinger R., Lambson B.E., Barker D.C., Davies C.R.: "Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in dog blood and bone marrow". *J. Clin. Microbiol.*, 38(2):748-51, 2000;
383. Reithinger R., Teodoro U., Davies C.R.: "Topical insecticide treatments to protect dogs from sand fly vectors of leishmaniasis". *Emerg. Infect. Dis.*, 7(5):872-6, 2001;
384. Reithinger R., Dujardin J.C.: "Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications". *J. Clin. Microbiol.*, 45(1):21-5, 2007;
385. Ribeiro J.M.: "Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists?". *Infect. Agents Dis.*, 4(3):143-52, 1995;
386. Riera C., Valladares J.E.: "Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs". *Parasitol. Today*, 12(10):412, 1996;
387. Riera C., Valladares J.E., Gállego M., Aisa M.J., Castillejo S., Fisa R., Ribas N., Carrió J., Alberola J., Arboix M.: "Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate". *Vet. Parasitol.*, 84(1-2):33-47, 1999;
388. Riera C., Fisa R., Udina M., Gállego M., Portus M.: "Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 98(2):102-10, 2004;
389. Riera C., Fisa R., Ribera E., Carrió J., Falcó V., Gállego M., Moner L., Molina I., Portús M.: "Value of culture and nested polymerase chain reaction of blood in the prediction of relapses

- in patients co-infected with *Leishmania* and human immunodeficiency virus". Am. J. Trop. Med. Hyg., 73(6):1012-5, 2005;
390. Rioux J. A., Lanotte J., Destombes P., Vollhardt Y., Croset H.: "Leishmaniosi expérimentale du Renard *Vulpes vulpes* (L.)". Recueil de Médecine Vétérinaire, 147:489-98, 1971;
 391. Rivò G., Poggi M., Mignone W., Mancianti F.: "Immunomigrazione nella diagnosi sierologica della leishmaniosi canina: prova comparativa con l'immunofluorescenza indiretta". Veterinaria, A.14(2):61-4, 2000;
 392. Roccabianca P.: "Il sistema immunitario cutaneo". Quad. Dermatol., A12(1):7-11, 2007;
 393. Rodríguez-Cortés A., Fernández-Bellón H., Ramis A., Ferrer L., Alberola J., Solano-Gallego L.: "Leishmania-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters in canine leishmaniasis". Vet. Immunol. Immunopathol., 116(3-4):190-8, 2007;
 394. Rohrs L.C.: "Leishmaniasis in the Sudan republic. XVIII. Parasitemia in kala-azar". Am. J. Trop. Med. Hyg., 13:265-71, 1964;
 395. Rossi E., Bongiorno G., Ciolli E., Di Muccio T., Scalone A., Gramiccia M., Gradoni L., Maroli M.: "Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy". Acta Trop., 105(2):158-65, 2008;
 396. Roura X.: "Scelte diagnostico-terapeutiche difficili in corso di leishmaniosi canina". In "Atti Incontro SIDEV", 25 febbraio 2001.
 397. Rosypal A.C., Troy G.C., Zajac A.M., Frank G., Lindsay D.S.: "Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle". J. Parasitol., 91(4):970-2, 2005[1];
 398. Rosypal A.C., Gogal R.M. Jr., Zajac A.M., Troy G.C., Lindsay D.S.: "Flow cytometric analysis of cellular immune responses in dogs experimentally infected with a North American isolate of *Leishmania infantum*". Vet. Parasitol., 131(1-2):45-51, 2005[2];
 399. Rosypal A.C., Lindsay D.S.: "Non-sand fly transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in experimentally infected BALB/c mice". J. Parasitol., 91(5):1113-5, 2005;
 400. Rohousová I., Volf P., Lipoldová M.: "Modulation of murine cellular immune response and cytokine production by salivary gland lysate of three sand fly species". Parasite Immunol., 27(12):469-73, 2005;
 401. Rougier S., Vouldoukis I., Fournel S., Pérès S., Woehrlé F.: "Efficacy of different treatment regimens of marbofloxacin in canine visceral leishmaniosis: A pilot study". Vet. Parasitol., 153(3-4):244-54, 2008;
 402. Roura X., Sánchez A., Ferrer L.: "Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique". Vet. Rec., 144(10):262-4, 1999;
 403. Roze M.: "Canine leishmaniasis. A spreading disease. Diagnosis and treatment". Eur. J. Comp. An. Pract., 15(1):39-52, 2005;
 404. Rüfenacht S., Sager H., Müller N., Schaerer V., Heier A., Welle M.M., Roosje P.J.: "Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland". Vet. Rec., 156(17):542-5, 2005;
 405. Ruiz De Gopegui R., Espada Y.: "Peripheral blood and abdominal fluid from a dog with abdominal distention". Vet. Clin. Pathol., 27(2):64, 1998;

406. Sacchi L., Calvi L.E., Kramer L.H., Ferroglio E., Grandi G., Clementi E., Corona S.: "The intradermal Leishmanin reaction induces antigen-specific maturation of canine dendritic cells with up-regulation of MHCII synthesis and expression". *J. Comp. Pathol.*, 135(1):17-24, 2006;
407. Sanchez-Robert E., Altet L., Sanchez A., Francino O.: "Polymorphism of Slc11a1 (Nramp1) gene and canine leishmaniasis in a case-control study". *J. Hered.*, 96(7):755-8, 2005;
408. Sanchez-Robert E., Altet L., Utzet-Sadurni M., Giger U., Sanchez A., Francino O.: "Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis". *Vet. Res.*, 39(3):36, 2008;
409. Santos M., Marcos R., Assunção M., Matos A.J.: "Polyarthritis associated with visceral leishmaniasis in a juvenile dog". *Vet. Parasitol.*, 141(3-4):340-4, 2006;
410. Santos-Gomes G.M., Campino L., Abranches P.: "Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95(2):193-8, 2000;
411. Saran R., Sharma M.C., Gupta A.K., Sinha S.P., Kar S.K.: "Diurnal periodicity of *Leishmania* amastigotes in peripheral blood of Indian Kala-azar patients". *Acta Trop.*, 68(3):357-60, 1997;
412. Saridomichelakis M.N., Mylonakis M.E., Leontides L.S., Billinis C., Koutinas A.F., Galatos A.D., Gouletsou P., Diakou A., Kontos V.I.: "Periodic administration of allopurinol is not effective for the prevention of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in the endemic areas". *Vet. Parasitol.*, 130(3-4):199-205, 2005[1];
413. Saridomichelakis M.N., Mylonakis M.E., Leontides L.S., Koutinas A.F., Billinis C., Kontos V.I.: "Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 73(1):82-6, 2005;
414. Sasanelli M., Paradies P., de Caprariis D., Greco B., De Palo P., Palmisano D., Carelli G.: "Acute-phase proteins in dogs naturally infected with *Leishmania infantum* during and after long-term therapy with allopurinol". *Vet. Res. Commun.*, 31 Suppl. 1:335-8, 2007;
415. Scarlata F., Vitale F., Saporito L., Reale S., Vecchi V.L., Giordano S., Infurnari L., Occhipinti F., Titone L.: "Asymptomatic *Leishmania infantum/chagasi* infection in blood donors of western Sicily". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 102(4):394-6, 2008;
416. Schalm O.W.: "Uncommon hematologic disorders: spirochetosis, trypanosomiasis, leishmaniasis, Pelger-Huet anomaly". *Canine Pract.*, 6:46-9, 1979;
417. Schettini D.A., Costa Val A.P., Souza L.F., Demicheli C., Rocha O.G., Melo M.N., Michalick M.S., Frézard F.: "Pharmacokinetic and parasitological evaluation of the bone marrow of dogs with visceral leishmaniasis submitted to multiple dose treatment with liposome-encapsulated meglumine antimoniate". *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 38(12):1879-83, 2005;
418. Schlein Y., Jacobson R.L., Shlomai J.: "Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector". *Proc. Biol. Sci.*, 245(1313):121-6, 1991;
419. Schlein Y., Jacobson R.L., Messer G.: "*Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(20):9944-8, 1992;
420. Schlein Y., Jacobson R.L.: "Mortality of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi* caused by plant feeding of the sand flies". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 50(1):20-7, 1994;

421. Schlein Y., Jacobson R.L.: "Sugar meals and longevity of the sandfly *Phlebotomus papatasi* in an arid focus of *Leishmania major* in the Jordan Valley". Med. Vet. Entomol., 13(1):65-71, 1999;
422. Schubach A., Cuzzi-Maya T., Gonçalves-Costa S.C., Pirmez C., Oliveira-Neto M.P.: "Leishmaniasis of glans penis". J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol., 10(3):226-8, 1998;
423. Semião-Santos S.J., el Harith A., Ferreira E., Pires C.A., Sousa C., Gusmão R.: "Évora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal". Parasitol. Res., 1(3):235-9, 1995;
424. Sharief A.H., Khalil E.A., Omer S.A., Abdalla H.S.: "Innovative serum-free medium for in vitro cultivation of promastigote forms of *Leishmania* species". Parasitol. Int., 57(2):138-42, 2008;
425. Sharma M.C., Gupta A.K., Das V.N., Verma N., Kumar N., Saran R., Kar S.K.: "*Leishmania donovani* in blood smears of asymptomatic persons". Acta Trop., 76(2):195-6, 2000;
426. Shaw J.J.: "New World Leishmaniasis: The Ecology of Leishmaniasis and the Diversity of Leishmanial Species in Central and South America". In "World Class Parasites: Volume 4 - Leishmania", ed. Jay P. Farrell, Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrech, London, 11-31, 2002;
427. Shortt H.E., Das Gupta C.R., Lal C.: "Diagnosis of indian Kala-azar". Indian J. Med. Res., 15:529-31, 1927;
428. Sideris V., Papadopoulou G., Dotsika E., Karagouni E.: "Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athena area, Greece". Eur. J. Epidem., 15:271-6, 1999;
429. Silva F.L., Rodrigues A.A., Rego I.O., Santos R.L., Oliveira R.G., Silva T.M., Xavier M.N., Nascimento E.F., Santos R.L.: "Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*". Vet. Parasitol., 151(1):86-90, 2008;
430. Silveira F.T., Lainson R., Shaw J.J., Ishikawa E.A., Souza A.A., Braga R.R.: "Sobre a sensibilidade da cultura de leucocitos circulantes na detecção de *Leishmania* no sangue periférico de pacientes com leishmaniose tegumen". Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 22(3):143-6, 1989;
431. Sindermann H., Engel J.: "Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis". Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 100 Suppl 1:S17-20, 2006;
432. Sisino G., Bellavia D., Corallo M., Geraci F., Barbieri R.: "A homemade cytospin apparatus". Anal. Biochem., 359(2):283-4, 2006;
433. Slappendel R.J.: "Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands". Vet. Q., 10(1):1-16, 1988;
434. Soares M.B., Titus R.G., Shoemaker C.B., David J.R., Bozza M.: "The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor". J. Immunol., 160(4):1811-6, 1998;
435. Soares M.J.V., Moraes J.R.E., Palmeira Borges V., Miyazato L.G., Moraes F.R.: "Renal involvement in visceral leishmaniasis dogs". J. Venom. Anim. incl. Trop. Dis., 11(4):579-93, 2005;
436. Solano-Gallego L., Llull J., Ramos G., Riera C., Arboix M., Alberola J., Ferrer L.: "The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection". Vet. Parasitol., 90(1-2):37-45, 2000;

437. Solano-Gallego L., Riera C., Roura X., Iniesta L., Gallego M., Valladares J.E., Fisa R., Castillejo S., Alberola J., Ferrer L., Arboix M., Portús M.: "*Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment". *Vet. Parasitol.*, 96(4):265-76, 2001[1];
438. Solano-Gallego L., Morell P., Arboix M., Alberola J., Ferrer L.: "Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology". *J. Clin. Microbiol.*, 39(2):560-3, 2001[2];
439. Solano-Gallego L., Llull J., Ramis A., Fernández-Bellón H., Rodríguez A., Ferrer L., Alberola J.: "Longitudinal study of dogs living in an area of Spain highly endemic for leishmaniasis by serologic analysis and the leishmanin skin test". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 72(6):815-8, 2005;
440. Solano-Gallego L., Rodríguez-Cortés A., Trotta M., Zampieron C., Razia L., Furlanello T., Caldin M., Roura X., Alberola J.: "Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis". *Vet. Parasitol.*, 147(3-4):315-9, 2007;
441. Stefani F.: "Preliminary study on evaluating the association of marbofloxacin, metronidazole, allopurinol in leishmaniotic dogs with renal failure". *Worldleish3 - Third World Congress on Leishmaniasis*. Palermo-Terrassini Sicily, Italy. 10–15 April 2005;
442. Stokes B.O.: "Principles of cytocentrifugation". *Lab. Med.*, 35(7):434-7, 2004;
443. Strauss-Ayali D., Jaffe C.L., Burshtain O., Gonen L., Baneth G.: "Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs". *J. Infect. Dis.*, 189(9):1729-33, 2004;
444. Strauss-Ayali D., Baneth G., Jaffe C.L.: "Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis". *Vet. Res.*, 38(4):547-64, 2007;
445. Symmers W.S.: "Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain". *Lancet*, 1:127-32, 1960;
446. Tabar M.D., Roura X., Francino O., Altet L., Ruizde Gopegui R.: "Detection of *Leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank". *J. Small. Anim. Pract.*, in stampa (DOI: 10.1111/j.1748-5827.2008.00542.x), 2008;
447. Tacchini-Cottier F., Milon G., Louis J.A.: "Th1 and Th2 cytokines in leishmaniasis". In "Cytokines and Chemokines in Infectious Disease Handbook". Ed. M. Kotb, T. Calandra, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 245-58, 2003;
448. Talmi-Frank D., Strauss-Ayali D., Jaffe C.L., Baneth G.: "Kinetics and diagnostic and prognostic potential of quantitative Western blot analysis and antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assay in experimental canine leishmaniasis". *Clin. Vaccine Immunol.*, 13(2):271-6, 2006;
449. Telford S.R. Jr.: "Evolutionary implications of *Leishmania* amastigotes in circulating blood cells of lizards". *Parasitology*, 79(3):317-24, 1979;
450. Terry L.L., Lewis J.L. Jr, Sessoms S.M.: "Laboratory infection with *Leishmania donovani*; a case report". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 30(5):643-9, 1950;
451. Thakur C.P., Kumar M., Kumar P., Mishra B.N., Pandey A.K.: "Rationalisation of regimens of treatment of kala-azar with sodium stibogluconate in India: a randomised study". *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)*, 296(6636):1557-61, 1988;
452. Thrall M.A., Weiser M.G.: "Hematology". In "Laboratory procedures for veterinary technicians", ed. C.M. Hendrix, 4th ed., Mosby, St. Louis, Missouri, USA, 29-74, 2002;

453. Torrealba J.W., Gomez-Nunez J.C., Ulloa G.: "Isolation of *Leishmania braziliensis* by intraperitoneal inoculation of blood from a reservoir host into hamsters". Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 66(2):361, 1972;
454. Travi B.L., Osorio Y., Melby P.C., Chandrasekar B., Arteaga L., Saravia N.G.: "Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp.". Infect. Immun., 70(5):2288-96, 2002;
455. Tselentis Y., Gikas A., Chaniotis B.: "Kala-azar in Athens basin". Lancet, 343:1635, 1994;
456. Tvedten H., Weiss D.: "The complete blood count and bone marrow examination: General comments and selected techniques". In "Small animal clinical diagnosis by laboratory methods", ed. M.D. Willard, H.T. Tvedten, G.H. Turnwald, 3rd ed., WB Saunders Company:11-30, 1999;
457. Vaidyanathan R.: "*Leishmania* parasites (*Kinetoplastida: Trypanosomatidae*) reversibly inhibit visceral muscle contractions in hemimetabolous and holometabolous insects". J. Invertebr. Pathol., 87(2-3):123-8, 2004;
458. Valladares J.E., Ruiz De Gopegui R., Riera C., Alberola J., Gállego M., Espada Y., Portús M., Arboix M.: "Study of haemostatic disorders in experimentally induced leishmaniasis in Beagle dogs". Res. Vet. Sci., 64(3):195-8, 1998;
459. Valladares J.E., Riera C., González-Ensenyat P., Díez-Cascón A., Ramos G., Solano-Gallego L., Gállego M., Portús M., Arboix M., Alberola J.: "Long term improvement in the treatment of canine leishmaniosis using an antimony liposomal formulation". Vet. Parasitol., 97(1):15-21, 2001;
460. Vamvakidis C.D., Koutinas A.F., Kanakoudis G., Georgiadis G., Saridomichelakis M.: "Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*)". Vet. Rec., 146(24):698-703, 2000;
461. Van Damme P.A., Keuter M., Van Assen S., DeWilde P.C., Beckers P.J.: "A rare case of oral leishmaniasis". Lancet Infect. Dis., 4(1):53, 2004;
462. van Eys G.J., Schoone G.J., Kroon N.C., Ebeling S.B.: "Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites". Mol. Biochem. Parasitol., 51(1):133-42, 1992;
463. Van Peenen P.F., Reid T.P. Jr.: "Leishmaniasis in the Sudan Republic. VI. Clinical and laboratory aspects of kala-azar in hospitalized patients from Upper Nile Province". Am. J. Trop. Med. Hyg., 11:723-30, 1962;
464. van Zandbergen G., Klinger M., Mueller A., Dannenberg S., Gebert A., Solbach W., Laskay T.: "Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages". J. Immunol., 173(11):6521-5, 2004;
465. van Zandbergen G., Bollinger A., Wenzel A., Kamhawi S., Voll R., Klinger M., Müller A., Hölscher C., Herrmann M., Sacks D., Solbach W., Laskay T.: "*Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103(37):13837-42, 2006;
466. Veiga J.P., Wolff E.R., Sampaio R.N., Marsden P.D.: "Renal tubular dysfunction in patients with mucocutaneous leishmaniasis treated with pentavalent antimonials". Lancet, 2(8349):569, 1983;
467. Vergel C., Palacios R., Cadena H., Posso C.J., Valderrama L., Perez M., Walker J., Travi B.L., Saravia N.G.: "Evidence for *Leishmania* (*Viannia*) parasites in the skin and blood of patients before and after treatment". J. Infect. Dis., 194(4):503-11, 2006;

468. Viljoen G.J., Nel L.H., Crowther J.R.: "Nested, Hemi-nested and Pit-stop PCR". In "Molecular Diagnostic PCR Handbook", Springer, Dordrecht, The Netherlands, 78-9, 2005;
469. Viñuelas J., García-Alonso M., Ferrando L., Navarrete I., Molano I., Mirón C., Carcelén J., Alonso C., Nieto C.G.: "Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs". *Vet. Parasitol.*, 101(1):23-7, 2001;
470. Volf P., Rohousová I.: "Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies". *Parasitology*, 122 Pt 1:37-41, 2001;
471. Vouldoukis I., Drapier J.C., Nüssler A.K., Tselentis Y., Da Silva O.A., Gentilini M., Mossalayi D.M., Monjour L., Dugas B.: "Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway". *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40(1):253-6, 1996;
472. Vouldoukis I., Rougier S., Dugas B., Pino P., Mazier D., Woehrlé F.: "Canine visceral leishmaniasis: comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate". *Vet. Parasitol.*, 135(2):137-46, 2006;
473. Wang C.W.: "The examination of blood smears for *Leishmania donovani* in kala-azar patients". *Chinese Med. J.*, 52:433-8, 1937;
474. Warburg A.: "The structure of the female sand fly (*Phlebotomus papatasi*) alimentary canal". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 102(2):161-6, 2008;
475. Werner L.L., Turnwald G.H.: "Immunologic and plasma protein disorders". In "Small animal clinical diagnosis by laboratory methods", ed. M.D. Willard, H.T. Tvedten, G.H. Turnwald, 3rd ed., WB Saunders Company, 254, 1999;
476. Willard M.D., Twedt D.C.: "Gastrointestinal, pancreatic, and hepatic disorders". In "Small animal clinical diagnosis by laboratory methods", ed. M.D. Willard, H.T. Tvedten, G.H. Turnwald, 3rd ed., WB Saunders Company, 172-207, 1999;
477. Winberg M.E., Rasmusson B., Sundqvist T.: "*Leishmania donovani*: Inhibition of phagosomal maturation is rescued by nitric oxide in macrophages". *Exp. Parasitol.*, 117(2):165-70, 2007;
478. Xavier S.C., de Andrade H.M., Monte S.J.H., Chiarelli I.M., Lima W.G., Michalick M.S.M., Tafuri W.L., Tafuri W.L.: "Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods". *BMC Veterinary Research*, 2:17 (doi:10.1186/1746-6148-2-17), 2006;
479. Yago A.: "Treatment for cutaneous leishmaniasis - a comparison between the effects of metronidazole and pentavalent antimony on the movement and multiplication of *Leishmania* promastigotes". *Japan. J. Trop. Med. Hyg.*, 19(4):371-85, 1991;
480. Young C.W., Van Sant H.M.: "*Leishmania donovani* in the peripheral blood". *J. Exp. Med.*, 38:233-56, 1923;
481. Zaffaroni E., Rubaudo L., Lanfranchi P., Mignone W.: "Epidemiological patterns of canine leishmaniasis in Western Liguria (Italy)". *Vet. Parasitol.*, 81:11-9, 1999;
482. Zafra R., Jaber J.R., Pérez-Écija R.A., Barragán A., Martínez-Moreno A., Pérez J.: "High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden". *Vet. Immunol. Immunopathol.*, in stampa (doi:10.1016/j.vetimm.2008.02.022), 2008;
483. Zaman V., Yap E.H.: "A concentration method for Plasmodia and Trypanosomes". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 66(2):370-1, 1972;

- 484. Zaragoza C., Barrera R., Centeno F., Tapia J.A., Durán E., González M., Mañé M.C.: "SDS-PAGE and Western blot of urinary proteins in dogs with leishmaniasis". Vet. Res., 34(2):137-51, 2003;
- 485. Zatelli A., Borgarelli M., Santilli R., Bonfanti U., Nigrisoli E., Zanatta R., Tarducci A., Guarraci A.: "Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms". Am. J. Vet. Res.; 64(5):558-61, 2003;
- 486. Zeledón R., McPherson B., Ponce C.: "Isolation of *Leishmania braziliensis* from a wild rodent in Costa Rica". Am. J. Trop. Med. Hyg., 26(5 Pt 1):1044-5, 1977;
- 487. Zini E., Castagnaro M., Lubas G., Zatelli A.: "3. Gestione del paziente proteinurico". In "Leishmaniosi canina: linee guida su diagnosi, stadiazione, terapia, monitoraggio e prevenzione. Parte I". Veterinaria, A21(3):27-31, 2007.

8. INDICE DELLE FIGURE

FIGURA 1 - DISTRIBUZIONE DI <i>LEISHMANIA</i> NEL VECCHIO MONDO (ANTONIOU <i>ET AL.</i> , 2008).	7
FIGURA 2 - AMASTIGOTI DI <i>LEISHMANIA</i> (FRECCHE) IN PAZIENTE UMANO (MANDELL <i>ET AL.</i> , 2005).	17
FIGURA 3 - RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DELLA STRUTTURA DI UN PROMASTIGOTE E DI UN AMASTIGOTE. A = ACANTOSOMA; AF = FILAMENTO ACCESSORIO; AX = ASSONEMA; BB = CORPO BASALE; BP = LAMINA BASALE; D = DESMOSOMA; DV = VESCICOLA INCLUSA Densa; G = APPARATO DI GOLGI; I = INVAGINAZIONE; K = CINETOPLASTO; L = LIPIDE; LY = LISOSOMA; M = MITOCONDRIO; MVB = CORPO MULTIVESCICOLATO; MT = MICROTUBULI SOTTOPELLECOLARI; N = NUCLEO; NE = MEMBRANA NUCLEARE; NU = NUCLEOLO; R = TASCA FLAGELLARE; RA = MICROTUBULI ASSOCIATI ALLA TASCA FLAGELLARE; RER = RETICOLO ENDOPLASMATICO RUGOSO; SC = STRATO SUPERFICIALE; SPM = MICROTUBULI SOTTOPELLECOLARI; SR = RETICOLO LISCIO; V = VACUOLO ASSOCIATO AL NUCLEO; VE = VESCICOLA (BRAY, 1974).	18
FIGURA 4 - CICLO BIOLOGICO DI <i>LEISHMANIA</i> NEL FLEBOTOMO: MORFOLOGIA TEMPORALE DEI PROMASTIGOTI ALL'INTERNO DELL'INTESTINO (KAMHAWI, 2006).	20
FIGURA 5 - IL LUME INTESTINALE DI UNA FEMMINA DI <i>PH. PAPATASI</i> È RIVESTITO DA EPITELIO CON MICROVILLI (MV) A CUI I PROMASTIGOTI (<i>L. MAJOR</i>) SI ANCORANO CON L'ESTREMITÀ FLAGELLARE LIBERA (FRECCHE) (A). FREQUENTEMENTE LE CELLULE EPITELIALI DIVENGONO ROTONDE E SI LIBERANO NEL LUME COSÌ CHE I PROMASTIGOTI TENDONO AD OCCUPARE GLI SPAZI LASCIATI LIBERI ANCORANDOSI DIRETTAMENTE ALLA PARETE (B). A LIVELLO DELLA VALVOLA STOMODEALE LA MORFOLOGIA DEI PROMASTIGOTI CAMBIA, ASSUMENDO UN ASPETTO "FLACCIDO" (C). MES (WARBURG, 2008).	22
FIGURA 6 - MODIFICAZIONI MORFOLOGICHE DI <i>LEISHMANIA</i> NEL FLEBOTOMO (BESTEIRO <i>ET AL.</i> , 2007).	22
FIGURA 7 - SCHEMA RIASSUNTIVO DEL CICLO BIOLOGICO DI <i>LEISHMANIA</i> . (1) IN SEGUITO ALLA PUNTURA DEL FLEBOTOMO, I PROMASTIGOTI VENGONO INGLOBATI DAI MACROFAGI DELL'OSPITE. (2) TRASFORMAZIONE DEI PROMASTIGOTI IN AMASTIGOTI (1-4 ORE) E DIVISIONE PER SCISSIONE BINARIA. (3) "SCOPPIO" DEI MACROFAGI CHE LIBERANO GLI AMASTIGOTI. (3.1) DIFFUSIONE DEGLI AMASTIGOTI ALLE CELLULE DEL SISTEMA RETICOLO-ISTIOCITARIO ED AGLI ORGANI INTERNI. (4-5) DOPO L'INGESTIONE DEGLI AMASTIGOTI DA PARTE DEL FLEBOTOMO, I PARASSITI SI TRASFORMANO IN PROMASTIGOTI CHE SI MOLTIPLICANO PER DIVISIONE BINARIA (6) E SI "AGGANCIANO" ALL'EPITELIO DELL'INTESTINO DELL'INSETTO, PER POI MIGRARE A LIVELLO ORALE E FARINGEO PRONTI PER LA TRASMISSIONE (7). AM, AMASTIGOTE; B, CORPO BASALE DEL FLAGELLO; DI, STADIO DI DIVISIONE; F, FLAGELLO LIBERO; FV, VACUOLO PARASSITOFORO; IN, CELLULA INTESTINALE; K, CINETOPLASTO; MA, MACROFAGI; N, NUCLEO; NH, NUCLEO DELLA CELLULA OSPITE (MEHLHORN, 2008).	25
FIGURA 8 - <i>PHLEBOTOMUS PAPATASI</i> ADULTO (MEHLHORN, 2008).	26
FIGURA 9 - MORFOLOGIA DELLE 4 FASI DI SVILUPPO DEI FLEBOTOMI (MEHLHORN, 2008).	27
FIGURA 10 - ISPESSENTAMENTO DELLA PARETE DEI CAPILLARI GLOMERULARI (FRECCHE) ED UN'AREA DI GLOMERULOSCLEROSI NODULARE (PUNTA DI FRECCIA) IN UN GLOMERULO, IN ASSOCIAZIONE A NEFRITE INTERSTIZIALE (ASTERISCO). MO 200X, COLORAZ. ACIDO PERIODICO DI SCHIFF (ARESU <i>ET AL.</i> , 2007).	37
FIGURA 11 - PARENCHIMA RENALE: MACROFAGI CON AMASTIGOTI IN SEDE INTERSTIZIALE. EE, BARRA 5 µm (SOARES <i>ET AL.</i> , 2005).	37
FIGURA 12 - ERITROFAGOCITOSI NEL MIDOLLO DI UN CANE POLISINTOMATICO: UNA GROSSA CELLULA MONONUCLEATA HA INGLOBATO 2 ERITROBLASTI (FRECCIA) E 3 AMASTIGOTI (PUNTA DI FRECCIA) (DIFF-QUICK, 1000x) (FOGLIA MANZILLO <i>ET AL.</i> , 2006).	40
FIGURA 13 - 3 AMASTIGOTI IN UN NEUTROFILO NELLO STRISCIO DI SANGUE DI UN CANE (MGG 100x) (FOGLIA MANZILLO <i>ET AL.</i> , 2005).	147
FIGURA 14 - NUMEROSI AMASTIGOTI EXTRACELLULARI NELLO STRISCIO DI SANGUE DI UN CANE (MGG 100x) (FOGLIA MANZILLO <i>ET AL.</i> , 2005).	147
FIGURA 15 - STRISCIO DI SANGUE PERIFERICO: NEUTROFILI PARASSITATI (DIFF-QUICK 1000x) (SANTOS <i>ET AL.</i> , 2006). ..	148
FIGURA 16 - CITOCENTRIFUGA CYTOSPIN II®.	152
FIGURA 17 - CYTOCLIP® (SINISTRA) ED ASSEMBLATO COMPLETO CYTOCLIP®, CARTA DA FILTRO, VETRINO E CYTOFUNNEL® (DESTRA).	152
FIGURA 18 - SCHEMA DELL'ASSEMBLAGGIO DEI COMPONENTI.	153
FIGURA 19 - SCHEMA DELLA SEZIONE TRASVERSALE DELLA CAMERA DELLA CITOCENTRIFUGA. IL CAMPIONE È IN CONTATTO CON IL VETRINO DA MICROSCOPIO E LA CARTA DA FILTRO. LE FRECCHE A RAPPRESENTANO LA FORZA IDRAULICA CHE TENDE A SPINGERE LE CELLULE NEL MEZZO ASSORBENTE. LA FRECCIA B RAPPRESENTA LA FORZA CENTRIFUGA CHE DETERMINA LA SEDIMENTAZIONE DELLE CELLULE SUL VETRINO (DA STOKES, 2004, MODIFICATO).	154

9. INDICE DELLE TABELLE

TABELLA 1 - LE SPECIE DI <i>LEISHMANIA</i> CHE CAUSANO LA MALATTIA NEL CANE E NELL'UOMO (ROZE, 2005).....	17
TABELLA 2 - INTERVALLI MINIMI E MASSIMI DELLE FREQUENZE DI SEGNI E SINTOMI CLINICI SEGNALATI IN LETTERATURA (SLAPPEDEL, 1988 [80 CASI]; SEMIÃO-SANTOS <i>ET AL.</i> , 1995 [93 CASI]; DENEROLLE, 1996 [125 CASI]; CIARAMELLA <i>ET AL.</i> , 1997 [150 CASI]; NOLI, 1999 [REVISIONE]; KOUTINAS <i>ET AL.</i> , 1999 [158 CASI]; BLAVIER <i>ET</i> <i>AL.</i> , 2001 [REVISIONE]; AMUSATEGUI <i>ET AL.</i> , 2003 [61 CASI]; SOARES <i>ET AL.</i> , 2005 [34 CASI]).	50
TABELLA 3 - RASSEGNA BIBLIOGRAFICA DI ALCUNI FARMACI UTILIZZATI NELLA TERAPIA SPECIFICA (DA CERUNDOLO, 2001; OLIVA <i>ET AL.</i> , 2004, MODIFICATI).....	63
TABELLA 4 - PROVE DI EFFICACIA DEL METRONIDAZOLO ED UTILIZZO CLINICO NELL'UOMO	69
TABELLA 5 - DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELLA LEISHMANIOSI CANINA (CIARAMELLA E DE LUNA, 1999).	86
TABELLA 6 - INTERVALLI DI FREQUENZA DEI RILIEVI DI LABORATORIO ASPECIFICI IN CORSO DI LEISHMANIOSI CANINA (%) (NOLI, 1999).	88
TABELLA 7 - PROTEINE SIERICHE: CARATTERISTICHE, FUNZIONI E VARIAZIONI (SEPARAZIONE SU GEL DI ACETATO DI CELLULOSA) (KANEKO, 1997).	91
TABELLA 8 - INTERPRETAZIONE DELLE ALTERAZIONI DELLE FRAZIONI ELETTROFORETICHE (WERNER E TURNWALD, 1999)..	95
TABELLA 9 - ELETTROFORETOGRAMMI.....	95
TABELLA 10 - GUIDA PRATICA SCHEMATICA ALLA DIAGNOSI MOLECOLARE DI LEISHMANIOSI (DA REITHINGER E DUJARDIN, 2007, MODIFICATO).	125
TABELLA 11 - RASSEGNA BIBLIOGRAFICA DELLE SEGNALAZIONI SULLA PARASSITEMIA IN SPECIE DIVERSE DAL CANE (STRISCI EMATICI O COLTURE DA SANGUE PERIFERICO).	141
TABELLA 12 - RASSEGNA BIBLIOGRAFICA DELLE SEGNALAZIONI SULLA PARASSITEMIA NEL CANE (STRISCI EMATICI O COLTURE DA SANGUE PERIFERICO).....	146
TABELLA 13 - SOGGETTI ORIGINARIAMENTE INSERITI NELLO STUDIO: SEGNALAMENTO ED ANAMNESI (AMBIENTALE).	156
TABELLA 14 - SOGGETTI ORIGINARIAMENTE INSERITI NELLO STUDIO: SINTOMI, SEGNI CLINICI E RILIEVI ASPECIFICI DI LABORATORIO (SONO OMESSI I SOGGETTI DI CUI NON SONO PERVENUTI I DATI).	157
TABELLA 15 - SOGGETTI ORIGINARIAMENTE INSERITI NELLO STUDIO: ESAMI EFFETTUATI.	158
TABELLA 16 - RISULTATI DEI TEST DIAGNOSTICI EFFETTUATI: È SEGNALATO IL RISULTATO POSITIVO (POS), NEGATIVO (NEG), NON GIUDICABILE (NG) O IL VALORE RILEVATO; LE CASELLE VUOTE RAPPRESENTANO ESAMI NON EFFETTUATI.	165
TABELLA 17 - COMPARAZIONE DEI RISULTATI TRA PCR (<i>GOLD STANDARD</i>) ED ESAME MICROSCOPICO DEL CITOCENTRIFUGATO. VP = VERI POSITIVI, FP = FALSI POSITIVI, FN = FALSI NEGATIVI, VN = VERI NEGATIVI.	167
TABELLA 18 - INDICI STATISTICI, FORMULE E RISULTATI (ALTMAN E BLAND, 1994[1][2]).....	167

10. RINGRAZIAMENTI

- Per il supporto tecnico e la fattiva collaborazione, si ringraziano: Francesca Mancianti¹⁵³, Michele Corazza¹⁵³, Marta Magi¹⁵³, Francesca Abramo¹⁵³, Simona Nardoni¹⁵³, Gaetano Ariti¹⁵³, Euro Rovini¹⁵³, Silvana Cecchi¹⁵³, Lucia Zaccaro¹⁵⁴ e Simone Gianecchini¹⁵⁴;
- Per il supporto tecnico e morale, si ringrazia: Cinzia Macchioni¹⁵⁵;
- Per la collaborazione, si ringraziano: Fulvia Gamboni¹⁵⁶, Flaminio Petragli¹⁵⁷, Irio Iacopini¹⁵⁷ e Federico Agostini¹⁵⁷;
- Per il supporto bibliografico, si ringraziano: Laura Bruni¹⁵³, Jacques Lamothe¹⁵⁸, Itzhak Brook¹⁵⁹, Alessandro Fogliazza¹⁶⁰, Luca Gandini¹⁶⁰, Francesco Stefani¹⁶¹ e William P. Shofner¹⁶²;
- Per il supporto morale, si ringraziano: Chiara De Biagi¹⁶³ e George Lubas¹⁵³.

Un ringraziamento speciale alla Mia Famiglia (Lelia, Piero, Giacomo, nonni, Circe e Maghino), per tutto.

¹⁵³ Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Pisa.

¹⁵⁴ Centro Retrovirus, Università degli Studi di Pisa.

¹⁵⁵ Saline di Volterra (PI).

¹⁵⁶ Venturina (LI).

¹⁵⁷ Montescudaio (PI).

¹⁵⁸ Carros (Francia).

¹⁵⁹ Department of Paediatrics, Georgetown University, Washington DC.

¹⁶⁰ Merial™ Italia.

¹⁶¹ Orbetello Scalo (GR).

¹⁶² Parmly Hearing Institute, Loyola University, Chicago.

¹⁶³ Canale Monterano (RM).